



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Immunologie et maladies infectieuses

Présentée et soutenue par :

Melle BEN HAIJ Nawal

le :

Titre :

Etude du Toll like receptor 4 comme récepteur de la protéine Tat du VIH-1
dans l'induction de l'IL-10 et du TNF- α par les monocytes humains.

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

Unité INSERM 1043, équipe 8 Infections virales persistantes et réponses de l'hôte.

Directeur(s) de Thèse :

Pr. E. Bahraoui

Rapporteurs :

Dr. Roger Legrand

Dr. Arnaud Moris

*Je dédie cette thèse à mes proches et plus particulièrement
à mon père et ma mère que j'aime plus que tout,*

REMERCIEMENT

J'exprime tout d'abord mes sincères remerciements aux membres du jury pour l'évaluation de mon travail de thèse. Merci aux Docteurs Roger Legrand et Arnaud Moris d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci aux membres du jury les Docteurs Oliviers Neyrolles, Hervé Prats et Olivier Schwartz d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. C'est un véritable honneur pour moi d'avoir pu composer un tel jury pour ma thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude auprès du Pr. Elmostafa Bahraoui pour m'avoir accueillie et fait confiance tout au long de ces années. Je vous remercie pour votre pédagogie, votre compréhension et votre disponibilité. Par votre soutien et vos expériences, vous avez grandement contribué à ma formation aussi bien scientifique que personnelle. J'ai appris, je pense, à votre contact tout les nécessaires requis pour faire face au dur Monde du travail. J'ai aussi appris à grandir et murer dans un contexte professionnel toujours en plein essor et qui demande continuellement une certaine adaptabilité. C'est ainsi que je vous exprime toute ma gratitude.

Un grand merci aux Docteurs Christian Davrinche et Jacques Izopet pour nous avoir accueilli aussi chaleureusement dans leur équipe 8 (Unité 1043) à l'INSERM Purpan. Je remercie tout particulièrement Mr. Davrinche pour m'avoir montré que la recherche peut-être réalisée dans un environnement scientifique consciencieux, agréable et souriant. Je vous remercie sincèrement pour votre aide précieuse dans la correction du manuscrit de thèse, mais aussi pour votre disponibilité, votre soutien et votre gentillesse. Un grand remerciement aussi au Docteur Eric Champagne avec qui parler science n'a pas de secret et avec qui c'est un véritable plaisir. Merci Eric d'avoir dépenser autant d'énergie à calculer notamment les affinités de liaisons. Mais surtout un grand merci pour votre lecture et vos corrections considérable concernant mon manuscrit. Par votre aide, j'ai pu prendre du recul et voir d'un autre œil mon mémoire. Aussi avec vos mots et votre soutien j'ai pu appréhender avec un peu moins de stress et un peu d'humour mon avenir, le post-doctorat et l'anglais du post-doctorat.

Je souhaite aussi remercier mes deux compagnons de « galères » : Olfa et Rémi. Je pense ne pas avoir assez de « maux/mots » pour décrire les moments passés avec vous. Vous avez été mes amis, mes confidents, mes soutiens, mes piliers tout au long de ces années. Des épaules sur qui compter aussi bien scientifiquement, que moralement ou personnellement. Tant de fou rires en votre compagnie pendant les « pauses » repas ou pendant les manips. Je n'oublierai pas nos petites boutades, chansons, chorégraphies et discussions derrière les portes à rigoler et refaire notre Monde. Je pense que l'on peut tenter de faire « Dance Youri PhD » ou encore les cours Florent, vu toute notre imagination (quelques fois refoulées...). Au fait si on prend un avion à Paris et qu'il reste surplace est-ce que au bout de 6h, vu que la Terre tourne, on se retrouve à New York ?! À méditer encore n'est-ce pas ?

Tout d'abord à toi ma petite « Mzougoat » je n'oublierai pas comment tu es forte et attachante. Toujours la banane, les bons plans et bien sur les converses aux pieds. Attention, ces quelques lignes vont peut-être choquer les personnes car je vais dévoiler ton petit coté obscur : Madame écoute du NTM dans ses écouteurs afin de faire face aux manips. On dirait pas mais voilà l'effet des thèses sur le cerveau humain... Maintenant que j'y pense, ne me veux pas si je te brevet à la NASA pour ta capacité d'aide mémoire pour Rémi et moi. Je sais toujours pas comment tu fais pour retenir et organiser autant de choses qui ne servent à rien (mais qui nous servent à nous !) dans ta petite tête. Aussi, merci pour ton caractère qui m'a beaucoup tempéré durant ces années et beaucoup supporté. Et Dieu seul sait comment mon caractère peut être difficile ! Madame politique, tu resteras toujours mon amie de « thèses de galères », de rêves, de fou rire, de repas et de bons plans. Mais aussi et surtout à mes yeux tu resteras toujours une excellente doctorante-chercheur avec beaucoup de patience et de pédagogie. Après, je pense que tu sais très bien ce que je pense de toi et nos thèses et j'espère que tu garderas que le meilleur de moi tout au long de ces années et que l'on ne s'oubliera pas.

A toi mon « petit ramucho » alias Rémi, mon compagnon de Tat comment te dire que tes blagues à la « Alex Goude » vont me manquer. Ton caractère rasta avec ta cool-attitude et tes conseils, souvent très bons et très censés, vont me manquer aussi. Même tes crises de « l'école des Fans » avec tes musiques que jamais personne ne fredonnent à voix-haute vont me manquer. A cause de toi d'ailleurs, j'ai eu dans la tête tout les jours de la semaine pendant près de 5 ans ta musique de portable de

l'année 2007. Tu rends compte !!! Aussi, tu es la seule personne que je connaisse à avoir le regard « extraterrestre ». Il faut que tu m'apprennes à le faire, ça peut toujours servir pour l'administration et pour éviter de faire de la « paperasse ». Donc, pour ça aussi je vais te breveté, tout comme Mzougoat, pour ta capacité à montrer de temps en temps que tu n'es pas sur notre planète. Je te souhaite à toi et ta moitié tout le bonheur du monde et aussi pleins de belles choses. J'essaierai d'être là pour ta thèse. Je rectifie, je serai là vu que je vais te poursuivre pour plagia (je plaisante).

Tellement de dossiers sur vous deux et tellement de choses partagés donc je vais m'arrêter là. Je vous ai pas souvent montré mais je l'admets, vous représenté 4 et 5 années de ma vie et je vous oublierai surtout pas.

Je tiens également à remercier chaleureusement toute l'équipe 8 « Infections virales persistantes et réponses de l'hôte ». A toi Hélène qui nous a bien aidé et avec qui ont a tous bien discuté de tu vois ce que je veux dire... Un mot (merci) pour le Docteur Bernard Mariamé pour votre gentillesse et votre aide. Merci à Stephane, Faouzi et Nabila pour leurs gentillesse et aussi pour m'avoir appris à avoir une réflexion positive sur les manips et sur l'avenir. Un grand merci aussi à toute l'équipe de Jacques Izopet qui ont grandement participé à nous montrer une autre facette du VIH. Un petit mot aux timides de l'équipe et aux derniers arrivés : Émeline, Johan, Charline allez courage, bientôt votre tour ! Merci à Daniel Carlier du CBD et à Danièle Gasparotto de l'INSERM Purpan, pour vos aides et surtout votre patience. Merci aux amis : Jérôme, Karim, Gavin, Sahar, les Nicolas, Raouf, Julie, Aude, Virginie, Johan, Amélie et j'en oublie pleins d'autres (je m'excuse par avance), avec qui j'ai bien discuté et que j'apprécie aussi. Merci pour vos conseils et vos encouragements.

Je tiens aussi à remercier les premières personnes qui ont contribué à ma formation de Master 2 recherche. Les Dr et Maître de Conférences Fabienne Rayne et Cécile Malnou qui m'ont beaucoup soutenue et supportée durant mon stage de M2R. Je vous remercie de m'avoir guidé dans mes premières manipulations. Merci d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions, d'avoir réussi à canaliser et

à structurer mes idées souvent éparées. Je vous remercie pour les remises en question qui ont été indispensables à la compréhension de mon sujet. Merci de m'avoir soutenu dans certains moments de paniques et de peur. Je n'aurais jamais assez de mots pour vous remercier. Bien évidemment, je n'oubli pas toutes les autres personnes du laboratoire à savoir : Fabrice, Kawtar, Virginie(s), Magali et même Pierre. Merci à tous de m'avoir supporté dans une si belle ambiance et d'avoir contribué de près à ma formation.

Enfin, Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé et encouragé tout au long de l'année : mes ami(e)s d'ici et d'ailleurs et ma famille. Un millions de merci à ma famille : sans vous je n'aurais pas pu tenir la thèse et je ne serais pas arrivée jusque là. A Kamel et à mes frères et sœurs Oiaïl & Touria, Nabil & Aurélie et Fayçal, j'espère que vous êtes tous fier de moi. A mes petits neveux, « inchallah » que vous arrivez à faire de bonnes études et que vous réussissiez dans la vie. Même si vous n'avez que 4 ans et 3 ans je vois déjà loin pour vous. Votre Tata vous aime fort mes petits diables. Enfin, le meilleur pour la fin : mes parents. A vous qui avez émigrés j'espère que vous êtes fiers de moi. A vous mes parents chéris, je dédie cette thèse car c'est à vous que je dois tout se que je suis et je serai. Que Dieu vous garde, je vous aime tant.

Finalement la thèse, c'est bien plus qu'un diplôme, c'est une aventure dont on est le héros. Maintenant, à moi une nouvelle aventure, qui, j'espère sera encore plus riche que celle-ci...

SOMMAIRE

ABSTRACT
RESUME

INTRODUCTION 1

Chapitre I. Le virus de l'immunodéficience humaine: un rétrovirus pas comme les autres 2

A. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) 3

A.1 Quelques généralités	3
A.1-a Découverte et origine du VIH	3
A.1-b Taxonomie, structure et organisation génomique du VIH	4
- Nomenclature et classification du VIH.....	4
- Structure du VIH : organisation génomique et protéique.....	5
A.1-c Tropisme du VIH	7
A.1-d Entrée et cycle réplcatif du VIH	8
- <i>Attachement et entrée du virus</i>	9
- <i>Décapsidation, RT et intégration</i>	12
- <i>Transcription, traduction, assemblage et libération des virions</i>	14
A. 2 La pathogenèse de l'infection par le VIH	15
A.2-a Le stade I/ Primo-infection	15
A.2-b Le stade II/III/ Phase chronique	16
A.2-c Le stade final : SIDA.....	18

B. Mécanismes de persistance et dérégulation du système immunitaire (SI) au cours de l'infection par le VIH..... 18

B. 1 Dérégulation du système immunitaire inné.....	18
B. 1-a. Le complément.....	19
B. 1-b. Les IFN et les cytokines	19
- <i>Les Interférons (IFN)</i>	20
- <i>Le Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) et l' interleukine-6 (IL-6)</i>	21
- <i>L' interleukine-10 (IL-10)</i>	22
B.1-c. Les cellules immunitaires innées.....	24
- <i>Les cellules dendritiques (DC)</i>	24
- <i>Les monocytes/macrophages</i>	25
- <i>Les cellules Natural Killer (NK)</i>	27
- <i>Les lymphocytes T$\gamma\delta$</i>	27
B. 2 Dérégulation du système immunitaire adaptatif.....	27
B. 2-a L'IL-12 et l'IL-27 deux cytokines Th1 inhibées au cours de l'infection par le VIH	28
B. 2-b Les lymphocytes Th17	29
B. 2-c Les lymphocytes Treg	30

C. Les protéines du VIH impliquées dans la dérégulation du système immunitaire et l'échappement du VIH..... 31

C. 1 Les protéines accessoires du VIH impliquées dans l'échappement du virus	31
C.1-a La protéine Nef	31
C.1-b Les protéines Vpu et Vpx.....	31
C.1-c La protéine Vif	32
C.1-d La protéine Vpr	33
C. 2 La protéine Tat : une protéine clefs dans l'évolution de l'infection par le VIH	33
C. 2-a Généralités sur la protéine Tat du VIH.....	33
- <i>Domaines de la protéine Tat</i>	33

- Structure de la protéine Tat.....	34
- Sécrétion/internalisation de la protéine Tat.....	35
- Modifications post-traductionnelles de la protéine Tat.....	36
C. 2-b Tat : un rôle essentiel dans la transactivation du génome viral	38
C. 2-c Tat, une protéine d'échappement du VIH : rôle dans la pathogénèse	41
- Rôle dans l'évasion, la propagation et la dissémination du VIH	41
* Dissémination.....	41
* Infection.....	42
* Progression de la maladie.....	42
- Effets de la protéine Tat du VIH sur le SNC.....	43
* Effets directs de Tat sur le SNC	44
* Effets indirects de Tat sur le SNC	45
C. 2-d Le rôle de Tat dans la dérégulation du réseau de cytokines.....	47
D. Problématique du laboratoire	48
Chapitre II. Les Toll Like Receptors (TLR) : rôle bénéfique pour le système immunitaire ou le virus ?.....	51
A. Avant-propos.....	52
B. Les sentinelles de l'immunité innée : les TLR.....	52
B. 1 Généralités sur les TLR.....	52
B. 1-a Origine des TLR	52
B. 1-b Structure des TLR	53
B. 1-c Activation des TLR	54
B. 2 Les différents TLR : leurs PAMPs et leurs rôles	55
B. 2-a Les TLRs intracellulaires/endosomaux	56
B. 2-b Les TLRs de surfaces	57
- Les TLR2/1, TLR2/6 et TLR5	57
- Le TLR4, un TLR pas comme les autres.....	57
B. 3 Les voies de signalisation des TLR	63
B. 3-a La signalisation dépendante de Myd88.....	64
B. 3-b La signalisation dépendante de TRIF	64
B. 4 Régulation de l'activation des TLR	65
B. 4-a Les leurres solubles	65
B. 4-b Les régulateurs transmembranaires	66
B. 4-c Les régulateurs intracellulaires.....	67
B. 4-d La modulation de l'expression des TLR	72
B. 4-e La régulation des TLR par apoptose des cellules	72
C. Le détournement des TLR par les virus	73
C. 1 Les TLR dans l'infection par le VIH	74
C. 1-a Le polymorphisme des TLR associé à l'infection par le VIH.....	74
C. 1-b La reconnaissance du VIH par les TLR	76
C. 1-c Le détournement des TLR au profit du VIH.....	77
- Détournement des TLR indirectement par le VIH : implication des co-infections et des cytokines	78
- Détournement direct des TLR par les protéines virales	79

RESULTATS.....	82
Manuscrit article 1.....	83
Revue 1	142
DISCUSSION / CONCLUSION.....	186
Annexe article 4	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	208

Abstract

In HIV-1 infected persons, we observed since the asymptomatic phase a deregulation of the cytokine network with a high production of TNF- α and IL-10. The proinflammatory cytokine, TNF- α , is linked to the hyperactivation of the immune system, the destruction of the gastrointestinal barrier and the pathogenesis associated with HIV-1 infection. The immunosuppressive cytokine, IL-10, is strongly associated with the weakening of the immune system and the progression of the infection toward AIDS.

Our group have shown that HIV-1 Tat protein, by the N-terminal domain 1-45, stimulates the production of TNF- α , IL-10, IL-6, IL-8, and IFN- γ by monocytes. In my thesis, we demonstrated the involvement of the Toll Like Receptor 4 (TLR4), in the secretion of TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ and IL-10 by HIV-1 Tat. These cytokines are produced after a direct, specific and strong interaction of Tat 1-45 with TLR4-MD2 and MD2 ($K_{0.5}$ between $4 \cdot 10^{-9}$ to 10^{-9} M). This interaction was demonstrated by complementary approaches including direct binding assay, immunoprecipitation, GST-pull-down and colocalization by confocal microscopy. We showed that Tat 1-45 activates TLR4-MD2 dynamin endocytosis which is essential for the signalisation and cytokine synthesis induced by Tat in monocytes. Indeed, we have demonstrated that TLR4-MD2-CD14 is essential for the activation of MAPkinases and NF- κ B induced by Tat in primary monocytes/macrophages. In addition, our work shows that Tat, by its 1-45 fragment, uses MyD88 and/or TRIF dependent pathways of the TLR4 to activate MAPkinases and NF- κ B which are essential for cytokines production. Interestingly, Tat protein by its interaction with TLR4-MD2 induces also the expression of SOCS1 and SOCS3, two negative regulators of the TLR4 and antiviral IFN pathways.

Thus, in our work we have demonstrated for the first time, the hijacking of an innate receptor: TLR4 by the viral Tat protein. Very early during infection, this interaction causes the cytokine network deregulation and contributes to the disease progression toward AIDS. This study may contribute to understand the mechanisms put in place by HIV to induce immunosuppression and also to identify new therapeutic targets for future treatments.

Résumé

Chez les personnes infectées par le VIH-1, on observe dès le stade asymptomatique une dérégulation du réseau de cytokines avec une forte production de cytokines proinflammatoires et immunosuppressives comme le TNF- α et l'IL-10. Le TNF- α est associé à l'hyperactivation du système immunitaire, la destruction de la barrière gastro-intestinale et la pathogénèse associée à l'infection. L'IL-10, elle, est une cytokine immunosuppressive fortement associée à la progression de la maladie vers le stade SIDA.

Nous avons montré que la protéine Tat du VIH-1, par son domaine N-terminal 1-45, agit à la membrane des monocytes pour produire le TNF- α et l'IL-10 mais aussi l'IL-6, l'IL-8 et l'IFN- γ . Au cours de ma thèse nous avons mis en évidence l'implication du « Toll Like Receptor 4 » (TLR4) dans la sécrétion de ces cytokines induite par Tat. Cette sécrétion se fait par une interaction directe, spécifique et forte du domaine 1-45 de Tat avec l'ectodomaine du TLR4-MD2 et du MD2 ($K_{0.5}$ entre 4.10^{-9} à 10^{-9} M). Cette interaction a été démontrée dans des tests de fixation direct, d'immunoprecipitation, de GST-pull down et de colocalisation par microscopie confocale. Tat induit aussi l'internalisation dynamine dépendante du complexe TLR4-MD2-CD14. Cette dernière est essentielle à la signalisation et à la synthèse de cytokines induites par Tat. En effet, nous avons montré l'implication du TLR4-MD2-CD14 dans l'activation des MAP kinases et du facteur de transcription NF- κ B induit par Tat pour la synthèse de cytokines. Ce travail montre aussi que Tat active les voies dépendantes de Myd88 et de TRIF du TLR4 afin d'activer les MAP kinases et NF- κ B, responsables de la production de cytokines. De façon intéressante, la protéine Tat 1-45, détourne l'activation du TLR4 afin d'induire l'expression de SOCS1 et SOCS3, deux régulateurs des voies du TLR4 et des voies de l'IFN antiviral.

Nos travaux ont démontré pour la première fois, le détournement d'un récepteur de l'immunité innée, le TLR4, par la protéine Tat. Ce mécanisme permettrait au VIH de déréguler le réseau de cytokines très précocement au cours de l'infection et ainsi participer à l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. Cette étude pourrait contribuer à la compréhension des mécanismes mis en place par le VIH pour induire l'hyperactivation et l'immunosuppression du système immunitaire et permettrait aussi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

INTRODUCTION

*Chapitre I.
Le virus de l'immunodéficience humaine:
un rétrovirus pas comme les autres*

A. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

A.1 Quelques généralités

A.1-a Découverte et origine du VIH

En 1981, les « *Centers for Diseases control and Prevention* » d'Atlanta aux Etats-Unis, font l'état de l'apparition d'un syndrome jusque là inconnu : le « *gay syndrom* ». Cette appellation fut désignée car les patients étaient tous des jeunes homosexuels souffrant d'immunodéficience inexpliquée associée à des pathologies rares telles que la pneumocystose ou le sarcome de Kaposi. En 1983 le VIH-1 fut identifié comme l'agent responsable de cette maladie. En effet, l'Institut Pasteur, en France, isole pour la première fois ce rétrovirus. L'année suivante, c'est l'équipe du Dr. Gallo du « *National Institute of Health* » à Baltimore, aux Etats-Unis, qui isole le virus. Ainsi, plusieurs noms lui furent attribués : LAV (Lymphoadenopathy associated virus), HTLV-III (human T cell lymphotropic virus type III) et ARV (AIDS associated retrovirus). Ce n'est qu'en 1986 qu'on le nomma officiellement virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Un deuxième virus : le VIH-2 fut découvert en 1986.

Plusieurs théories ont été évoquées pour tenter d'expliquer l'origine du VIH. Des études phylogénétiques ont permis de montrer que ce virus aurait pour origine le virus de l'immunodéficience simienne (SIV). La transmission se serait faite par contacts fréquents de l'Homme avec les singes qui sont les hôtes naturels du SIV. D'un point de vue génétique, ce serait une accumulation de mutations qui aurait permis au SIV de s'adapter à l'Homme et traverser la barrière de l'espèce. Il apparaît que le VIH-1 provient de SIV infectant les chimpanzés et les gorilles d'Afrique Centrale (SIVcpz, SIVgor). Le VIH-2, beaucoup moins pathogène que le VIH-1, a pour origine, le SIV de sooty mangabeys d'Afrique de l'Ouest (SIVsmm) (1). Des études montrent aussi la transmission du SIV à des macaques en captivité. En effet, le SIVmac, isolé en 1983, aurait été introduit chez le macaque suite à une épidémie, dans les années 1960, de singes Rhésus provenant d'un centre de primatologie Californien. De façon surprenante, contrairement aux macaques et à l'Homme, l'infection des singes (chimpanzés, gorilles et sooty mangabeys) par le SIV est généralement asymptomatique. Malgré des charges virales fortes, ces singes ne semblent pas développer, ou uniquement après une très longue période, l'immunodéficience et la maladie associée à l'infection.

A.1-b Taxonomie, structure et organisation génomique du VIH **- Nomenclature et classification du VIH**

Le VIH est un lentivirus appartenant à la famille des *Retroviridae* et à la sous-famille des virus complexes dite : Orthoretrovirinae (2). Les lentivirus sont caractérisés par leurs capacités à infecter principalement les cellules du système immunitaire et conduire à une immunosuppression. Pour le VIH, il s'agit des lymphocytes T CD4 (T CD4) (3). L'infection de ces cellules clefs du système immunitaire entraîne le déclin progressif des T CD4, jusqu'à des valeurs inférieures à 200 T CD4/ μ L de sang, provoquant l'affaiblissement du système immunitaire. De plus, dès le stade asymptomatique, on observe chez les patients infectés par le VIH un affaiblissement du système immunitaire qui est associé à une dérégulation du réseau de cytokines. Cette dernière oriente alors la réponse immune vers un profil Th2, inefficace pour l'élimination du virus. Tout ceci conduit aux développements d'infections opportunistes et à des troubles neurologiques souvent fatals chez l'homme.

On retrouve deux sous-types de VIH : le VIH de type 1 (VIH-1) et le VIH de type 2 (VIH-2). En dépit de la forte homologie de séquence (40-60%), le VIH-2 est beaucoup moins pathogène (4). Alors que le VIH-1, majoritaire, est disséminé à travers le monde, le VIH-2, localisé en Afrique occidentale, est endémique. Le VIH-1 peut être subdivisé en trois souches selon sa séquence nucléotidique: les souches M (Majeur), N (New ou Non M non O) et O (Outlier) (4). La souche M est la plus répandue et représente plus de 95% des isolats mondiaux. Contrairement aux souches N et O qui ne se subdivisent pas en sous-groupes, la variabilité du gène *env* de la souche M a permis d'identifier au moins 11 sous-groupes selon leurs régions endémiques (A à K) (5). Par exemple, les infections en Amérique du Nord et en Europe sont surtout dues au sous-groupe B alors que le sous-groupe C est plus présent en Inde et en Afrique du Sud. Néanmoins, au moins 15 autres CRF (Circulating Recombinant Forms) ont été identifiées chez des patients vivants dans des régions géographiques différentes (6). Ces CRF semblent être plus présentes en Afrique, en Asie du Sud et en Amérique. Seul 5 sous-groupes ont été identifiés pour le VIH-2 (A à E). Malgré l'existence *in vivo* de co-infections VIH-1/VIH-2, aucune recombinaison génétique entre ces deux virus n'a été décrite.

- Structure du VIH : organisation génomique et protéique

Le VIH est un virus enveloppé, produit sous forme de virions immatures suite au bourgeonnement des cellules cibles infectées. Après maturation par les protéases virales et cellulaires, les virions adoptent une forme sphérique d'environ 90 – 100 nm de diamètre (figure 1). La glycoprotéine d'enveloppe est présente à la surface des virions sous forme d'un trimère de gp120/gp41. On estime à 10 le nombre de trimères présents à la surface d'une particule virale. Sous l'enveloppe, une matrice protège une capside de forme conique composée de la protéine virale p24. Cette dernière, renferme à son tour le génome du VIH.

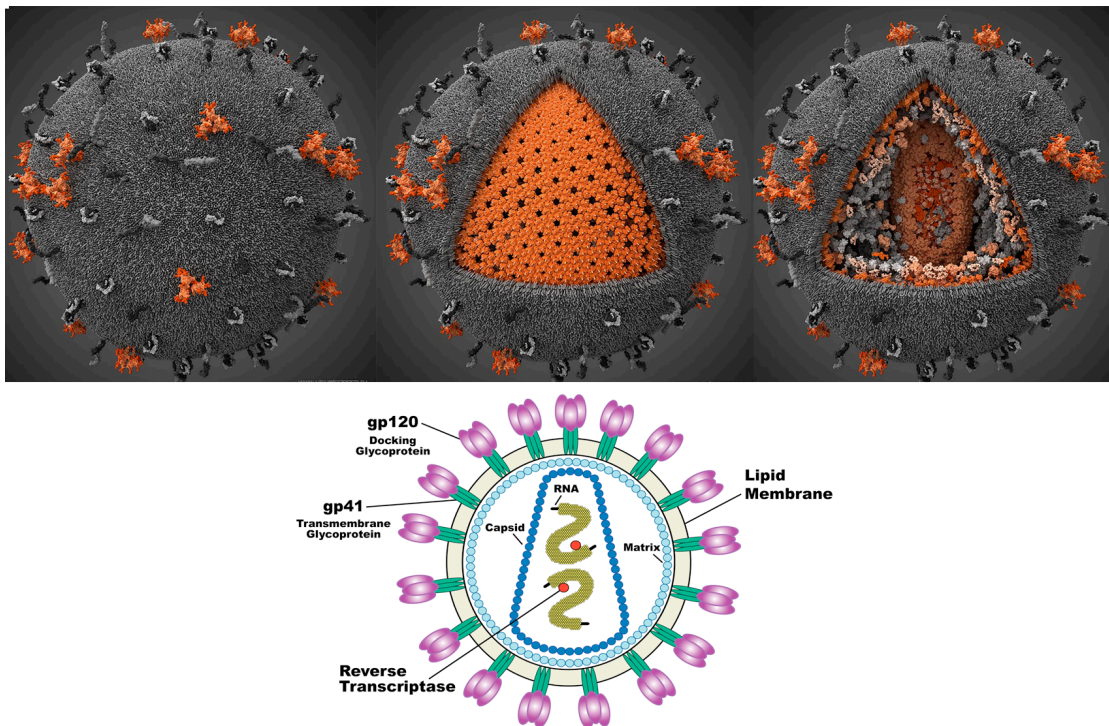


Figure 1. Représentation de la structure tridimensionnelle du VIH-1. Cette représentation résume les résultats de plus de 100 publications scientifiques récentes dans les domaines de la virologie, de l'analyse aux rayons X et de la résonance magnétique nucléaire (RMN). Ce modèle du VIH-1, fait la couverture du numéro spécial de « Nature Medicine » (8 Septembre 2010). En dessous, la représentation schématisée d'une particule du VIH.

Le génome du VIH, d'environ 9,7 kb, est constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive codant 16 protéines distinctes (7). Cet ARN, polyadénylé en 3' et coiffé en 5', est associé à une reverse transcriptase (RT), une intégrase (IN) et des nucléoprotéines (Np). Une représentation schématisée du génome et des protéines codées par ce dernier est illustrée dans la figure 2. Comme pour tous les rétrovirus, le génome du VIH-1 code 3 gènes de structure: *gag*, *pol* et *env*. Le premier gène, *gag*, code pour un précurseur p55. Le clivage de ce précurseur par la protéase virale permet de donner les protéines de structure

du VIH : la capside p24, la matrice p17 et les protéines de la nucléocapside p7 et p6. Le second gène, *pol*, code 3 protéines enzymatiques: la protéase p11, la reverse transcriptase p65/51 et l'intégrase p32. Enfin, le troisième gène *env*, code un précurseur : gp160 qui est clivé plus tardivement par des protéases cellulaires en 2 protéines de structures: gp120 et gp41. Ces étapes de maturation par les protéases cellulaires et virales sont essentielles à la production de virions infectieux matures.

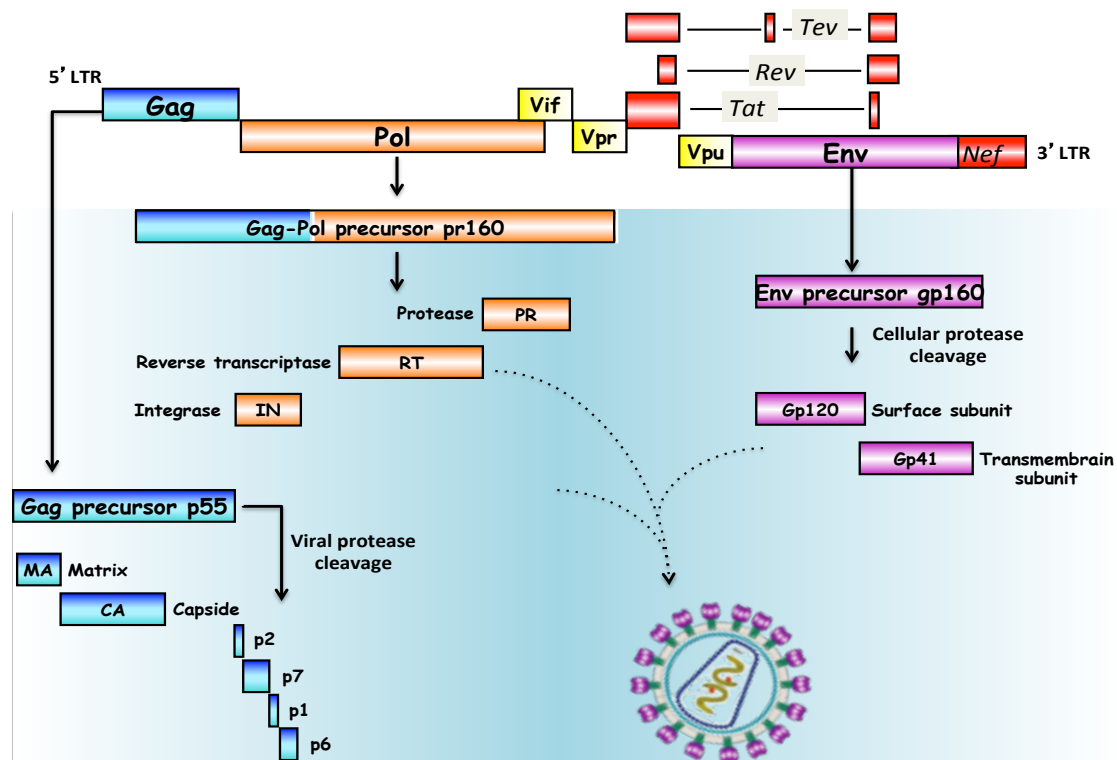


Figure 2. Organisation génomique du VIH-1. Les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont les précurseurs pour la synthèse des protéines virales. Ces précurseurs sont clivés par la protéase virale pour former 9 sous-unités matures : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN), la matrice (MA), la capside (CA), p2, la nucléocapside (NC), p1 et p6. Le précurseur de l'enveloppe est clivé par diverses protéases cellulaires pour donner la gp120 et la gp41. Le génome du VIH code aussi pour des protéines accessoires et régulatrices dont le transactivateur transcriptionnel (Tat), le facteur d'infectivité virale (Vif), les protéines virales u (Vpu), et r (Vpr), la protéine Rev et le facteur négatif (Nef). *Tev* contient des séquences de Tat, Rev et Env et fonctionne comme Tat et Rev.

Le génome du VIH code aussi pour 2 protéines régulatrices, essentielles à la réplication virale : Tat (transactivateur de la transcription), Rev (protéine régulatrice des gènes viraux) et 4 protéines accessoires : Vif (facteur d'infectivité viral), Vpr (protéine viral r), Vpu (protéine viral u) et Nef (facteur négatif) (8). Les protéines Tat et Rev sont des protéines précoces dont l'expression est essentielle à la réplication virale. En absence de l'une des deux protéines, le cycle viral du VIH est abortif. Plus précisément, la protéine Tat est impliquée activement dans l'initiation, l'élongation et la stabilisation des ARNm transcrits du VIH. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de la transcription des génomes viraux et de

la réplication du VIH par Tat sera détaillée plus loin (page 38). La protéine Rev, elle, interagit avec l'élément de réponse (RRE) localisé dans la séquence du gène *env* (8). Cette interaction permet aux ARNm mono et non épissés d'être transportés du noyau vers le cytoplasme. Ainsi localisés dans le cytoplasme, ces ARN pourront être traduits en protéines, ou encapsidés dans des particules virales naissantes.

Tout comme Tat et Rev, la protéine Nef est aussi une protéine produite précocement au cours du cycle viral. Elle joue un rôle important dans l'infectivité, la propagation du virus et l'évolution de la maladie. De part sa myristoylation, la protéine Nef associée aux virions, peut augmenter l'infectivité de ces derniers. De plus, elle peut interagir avec les molécules de CD4, récepteur du VIH, et diminuer leurs expressions de surface. Ainsi, Nef limite la surinfection des cellules infectées. En outre, il lui a été attribué un rôle essentiel dans l'étape de reverse transcription et dans la transmission cellule-cellule du virus.

La protéine Vif intervient dans les étapes finales du cycle viral. Notamment, Vif permet une meilleure maturation des virions et une réduction du nombre de particules virales défectueuses produites. En effet, Vif est impliquée dans la maturation et l'assemblage des protéines de structures ainsi que dans la stabilisation du complexe de pré-intégration et l'encapsidation du virus (9). La protéine Vpr facilite la localisation nucléaire des acides nucléiques viraux et plus particulièrement celle du complexe de pré-intégration (PIC). Elle stimule aussi l'expression génique et affecte le cycle réplicatif des cellules infectées (arrêt du cycle en phase G2).

Enfin, une dernière protéine: Vpu, exprimée uniquement dans le VIH-1, facilite la libération des virions par bourgeonnement. Un homologue de Vpu : Vpx, est exprimé dans le VIH-2 et aurait des fonctions similaires. De nombreuses études ont mis en évidence l'association des protéines Vpr, Vif, Nef et Tat aux particules virales.

A.1-c Tropicisme du VIH

Le VIH infecte principalement les cellules du système immunitaire. Par ses glycoprotéines d'enveloppe, le VIH reconnaît le récepteur CD4 à la surface des cellules. La pénétration du virus requiert ensuite, l'interaction avec un corécepteur : CCR5 (virus R5 tropique) et/ou CXCR4 (virus X4 tropique) menant à la fusion entre les membranes cellulaires et virales (10-13). D'autres récepteurs de chimiokines ont été également décrits comme pouvant servir de corécepteurs du VIH comme CCR2b, CCR3, CCR8, Cx3CR1 et CxCL16 (14). Ainsi, c'est l'expression des récepteurs et corécepteurs qui définissent les cellules cibles du VIH. En effet, lors de la primo-infection, le VIH reconnaît et infecte

principalement les cellules exprimant CD4 et CCR5, présents majoritairement sur les T CD4 activés et les monocytes/macrophages (15). Ce n'est qu'au cours de l'évolution de la maladie que le virus évolue vers un tropisme X4 dirigé essentiellement contre les L_T (16, 17). Cette évolution de tropisme corrèle avec la progression de la maladie vers le stade tardif de l'infection : le stade SIDA. Néanmoins, de nombreux travaux ont démontré la capacité du VIH à s'adsorber et/ou infecter des cellules autres que les monocytes/macrophages et L_T. C'est le cas de certaines cellules dendritiques (DC) telles que les cellules de Langerhans. Cependant, l'interaction VIH/DC-SIGN peut servir à faciliter l'infection des CD4. Ainsi, le VIH adsorbé sur les récepteurs DC-SIGN, DCIR, les langerines ou les récepteurs au mannose, est véhiculé aux organes lymphoïdes secondaires. Tout comme les DC, les neutrophiles et les cellules épithéliales sont aussi capables d'adsorber, séquestrer et disséminer le virus. De nombreux types cellulaires ont également été décrits comme étant faiblement permissifs au VIH et ainsi constituer des réservoirs du VIH. Il s'agit principalement des mastocytes, des cellules NK (Natural Killer), des astrocytes, des cellules endothéliales ou encore des cellules adipeuses. Notons que malgré la pléiade de cellules cibles décrites pour le VIH, ses cibles préférentielles restent les macrophages et les lymphocytes T CD4.

A.1-d Entrée et cycle répliatif du VIH

Le cycle viral du VIH peut être divisé en plusieurs étapes clefs : l'attachement suivi de l'entrée par fusion et la décapsidation du virus dans la cellule cible, la transcription inverse du génome, par la transcriptase inverse virale, la translocation nucléaire du PIC (complexe de pré-intégration), l'intégration du provirus au génome cellulaire, la transcription du provirus après activation cellulaire, l'épissage et la translocation cytoplasmique des ARN épissés ou non, la traduction de l'ARN viral et enfin l'assemblage et l'encapsidation de l'ARN génomique suivi du bourgeonnement des particules virales immatures et leurs maturation. Chacune de ces étapes du cycle viral, illustrée dans la figure 3, représente une cible potentielle pour le développement de molécules antivirales.

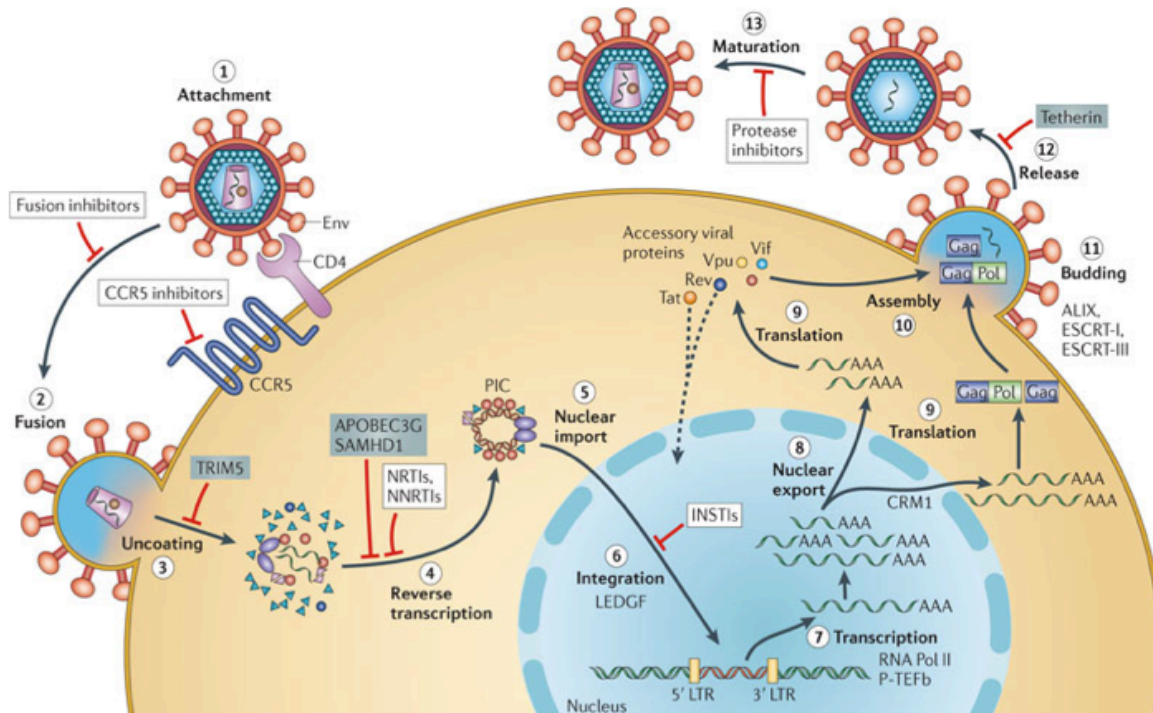


Figure 3. Cycle viral du VIH et cibles potentielles des molécules antivirales (18). La glycoprotéine d'enveloppe (Env) engage le récepteur CD4 et le corécepteur des chimiokines CCR5 et/ou CXCR4 (étape 1) qui conduit à la fusion des membranes virales et cellulaires et à l'entrée du VIH (étape 2). La décapsidation du virus près de la membrane nucléaire (étape 3), facilite la transcription inverse (étape 4) donnant le complexe de pré-intégration (PIC). Suite à l'import nucléaire (étape 5), le provirus s'intègre à la chromatine cellulaire en faisant intervenir la LEDGF (étape 6). La transcription du provirus (étape 7) est médiée par l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et le facteur positif d'élongation de la transcription b (P-TEFb) pour donner des ARNm viraux. Ces derniers quittent le noyau grâce à la protéine virale Rev et le complexe de transport de l'hôte incluant la protéine CRM1 (étape 8). Ces ARNm, de différentes tailles, permettent la production de protéines virales (étape 9). Le génome est lui, incorporé dans des particules virales (étape 10). Après assemblage, les virions sont produits par bourgeonnement de la cellule *via* les complexes ESCRT et ALIX (étape 11 et 12). Cette étape est suivie par la maturation des virions par les protéases (étape 13) afin d'obtenir des particules virales matures infectieuses.

Chaque étape du cycle viral est une cible potentielle pour les molécules antivirales. Les sites d'action des inhibiteurs cliniques (cases blanches) et des facteurs de restriction cellulaires (cases bleues) sont indiqués. INSTI, integrase strand transfer inhibitor; LTR, long terminal repeat; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor.

- Attachement et entrée du VIH

Le VIH se transmet principalement par contacts avec les fluides corporels (sang, sperme, lait maternel). Une fois dans l'organisme, le VIH infecte les cellules T CD4, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (DC) (19). L'entrée du VIH se fait principalement par fusion (20, 21) bien que le mécanisme d'entrée par endocytose a été récemment discuté (22-24). L'adsorption du virus sur la cellule cible se fait après la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe, gp120, à son récepteur CD4 à la surface des cellules. Cette

interaction gp120-CD4, de forte affinité ($K_d = 10^{-9}$ M), est médiée par les domaines conservés de la gp120 et le premier domaine du CD4. L'entrée du VIH dans les cellules requiert cependant une seconde interaction avec un corécepteur : CCR5 ou CXCR4 (figure 4).

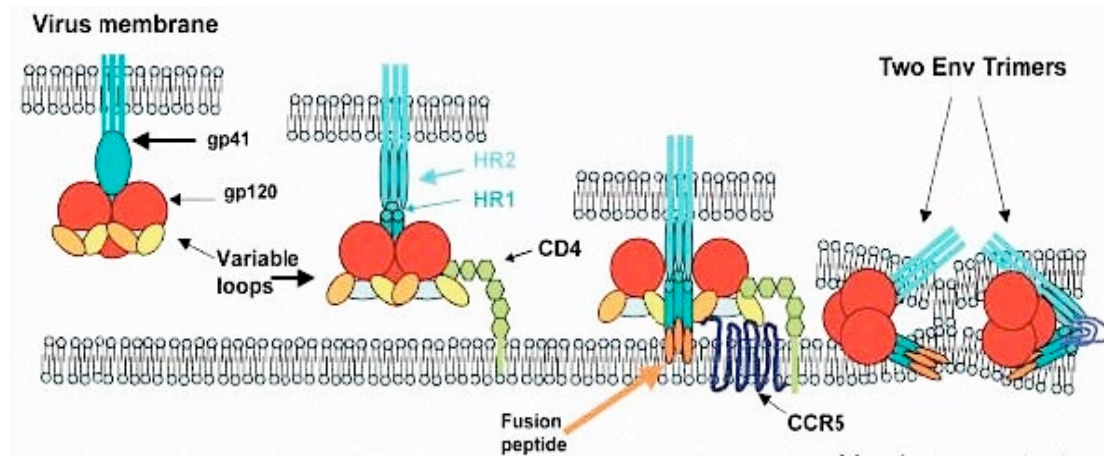


Figure. 4 : Représentation des différentes étapes d'entrée virale, après fusion des membranes [adapté de (25)]. Le mécanisme d'entrée du VIH est résumé dans le modèle ci-dessous. Après liaison de la gp120 au récepteur et corécepteur, la gp41 subit des changements de conformation. Ces derniers, conduisent à l'exposition du peptide de fusion et à l'accessibilité du domaine N-terminal hydrophobe du trimère HR1 contenant la région fusogène, et le trimère HR2. L'interaction HR1 et HR2 forme alors un faisceau de 6 hélices conduisant à la fusion membranaire et à l'entrée du virus. La structure en triple brin de superhélice, explique sans doute la faible immunogénicité chez les patients infectés.

Suite à l'interaction gp120-CD4, la gp120 subit un changement de conformation qui lui permet d'exposer sa région V3. Cette région V3 est impliquée dans la liaison avec le corécepteur. L'interaction gp120-CCR5 ou gp120-CXCR4 est responsable d'un second changement de conformation de la glycoprotéine transmembranaire, la gp41. Ceci permet alors d'exposer le domaine N-terminal hydrophobe de la gp41, correspondant au domaine de fusion du VIH. Commence alors un phénomène dynamique où les trimères HR1 (N36) et HR2 (C34) forment une structure en épingle à cheveux à 6 hélices, qui rapproche et fusionne les membranes cellulaires et virales (26) (figure 4). Notons que les corécepteurs du VIH, sont préférentiellement exprimés au niveau des microdomaines lipidiques appelés rafts (27). La richesse des rafts en cholestérol et en sphingolipides offre probablement un environnement idéal pour une fusion membranaire efficace et rapide (21, 28).

De façon intéressante, une très faible immunogénicité des domaines conservés de la gp120 a été observée chez les patients infectés par le VIH-1. Cette observation a suscité un grand intérêt dans la recherche de traitement de l'infection au VIH. Beaucoup d'équipes se sont penchées sur la génération d'anticorps à large spectre, neutralisant ces domaines conservés de la gp120. Ces anticorps pouvant neutraliser l'interaction gp120-CD4, inhiberaient l'entrée et l'infection des cellules par tous les sous-types du VIH-1. Ainsi, la conception de vaccins

candidats potentiels basée sur la neutralisation de ces domaines conservés de la gp120 continue activement à faire l'objet d'études. Plusieurs inhibiteurs d'entrée du virus ont été développés et testés. C'est le cas de l'enfuvirtide, plus connu sous le nom de T20. Ce peptide synthétique, de 36 acides aminés, bloque l'entrée du VIH-1 en interférant avec la formation de la structure à 6 hélices obtenue par l'interaction des HR1 et HR2 de la gp41 (29). Récemment, un antagoniste de CCR5 nommé Maraviroc ou Vicriviroc a été développé. Il bloque l'interaction gp120-CCR5 (30). Tout comme le T20, le Maraviroc est actif à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Les antagonistes de CCR5 présentent un grand intérêt dans la mesure où l'on sait que la primo-infection par le VIH-1 est essentiellement médiée par des virus R5 tropiques. L'utilisation de ce type d'inhibiteurs d'entrée inhibe efficacement, *in vitro* et *in vivo*, l'infection des cellules par des souches R5 résistantes aux autres classes d'antirétroviraux (inhibiteurs de la transcriptase inverse et de la protéase). Notons que c'est la première classe de médicament anti-VIH ciblant les cellules hôtes plutôt que le virus directement. Toutefois, leurs utilisation présente quelques limitations, comme la sélection et l'émergence rapide de virus X4. En effet, les patients n'ayant pas reçu de trithérapie présentent dans 85% des cas un virus R5 alors que les patients développant le stade tardif du SIDA présentent dans 50% des cas des souches X4 (31, 32). Ce tropisme R5 est d'autant plus important que les personnes ayant une délétion sur le gène de *ccr5*, *ccr5delta32*, résistent naturellement à l'infection (33-36). L'unique cas de « véritable guérison » contre l'infection par le VIH-1 a été observé chez un patient atteint d'une leucémie qui a reçu une allogreffe d'un donneur homozygote pour la délétion *delta32*. Les mécanismes moléculaires du switch R5-X4 restent très débattus. En plus de ces 2 tropismes, des virus intermédiaires, capables d'utiliser indifféremment CCR5 ou CXCR4 nommés « dual tropic » ou « R5X4 tropic », ont été observés chez des patients séropositifs pour le VIH-1.

De plus, la gp120 est une protéine fortement N-glycosylée qui confère au VIH un avantage précieux (37). Cette forte glycosylation de la gp120 lui permet d'échapper au système immunitaire, de résister à la dégradation par les protéases, d'adopter une structure conformationnelle native et de lier les récepteurs cellulaires. Par ses carbohydrates, la gp120 peut être reconnue et interagir avec une forte affinité ($K_d \approx nM$) avec le récepteur DC-SIGN présent à la surface des DC et monocytes/macrophages (38, 39). Lors de la primo-infection, les DC mucosales, qui sont parmi les premières cellules en contact avec le VIH, peuvent lier le virus par DC-SIGN. Cette interaction ne déclenche pas les changements de conformation nécessaires pour catalyser le mécanisme de fusion des membranes. Cependant, elle joue un

rôle essentiel dans la capture des antigènes par les DC, l'apprêtement et la présentation des antigènes aux T CD4 des ganglions lymphatiques.

- Décapsidation, reverse transcription et intégration du VIH

Suite à la pénétration du virus, la transcriptase inverse virale (RT) permet la formation d'un ADN bicaténaire flanqué de 2 séquences répétées, les LTR (*Long Terminal Repeats*) (figure 5). Cette transcription inverse est un processus complexe et ordonné, débutant dans la capside. Elle nécessite l'intervention de nombreuses protéines virales (MA, NC, RT, IN, Vpr, ARN viraux) et cellulaires (40, 41). Brièvement, la transcription inverse est débutée par une étape d'initiation qui consiste en la fixation d'un ARNt_{lys} à l'extrémité 5' de l'ARN viral. Cette fixation se fait *via* les 18 nucléotides de la partie 3'OH du primer d'ARNt avec la région PBS de l'ARN viral. Le complexe de transcription inverse synthétise ensuite le brin d'ADN de polarité négative. Le brin d'ARN hybridé à l'ADN est dégradé par l'activité RNase H de la RT. Les régions riches en polypurines (PPT) ne sont pas dégradées. Puis, la synthèse du deuxième brin d'ADN de polarité positive, est initiée aux amorces PPT présentes au niveau de la région 3' (U3) et centrale (cPPT) du génome. Un chevauchement de deux segments de taille identique, appelé « triplex central », résulte en un déplacement des 99 premiers nucléotides du brin d'ADN + appelé le "DNA-Flap". Il représente la fin de la transcription inverse et il semble jouer un rôle important dans l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (42-44).

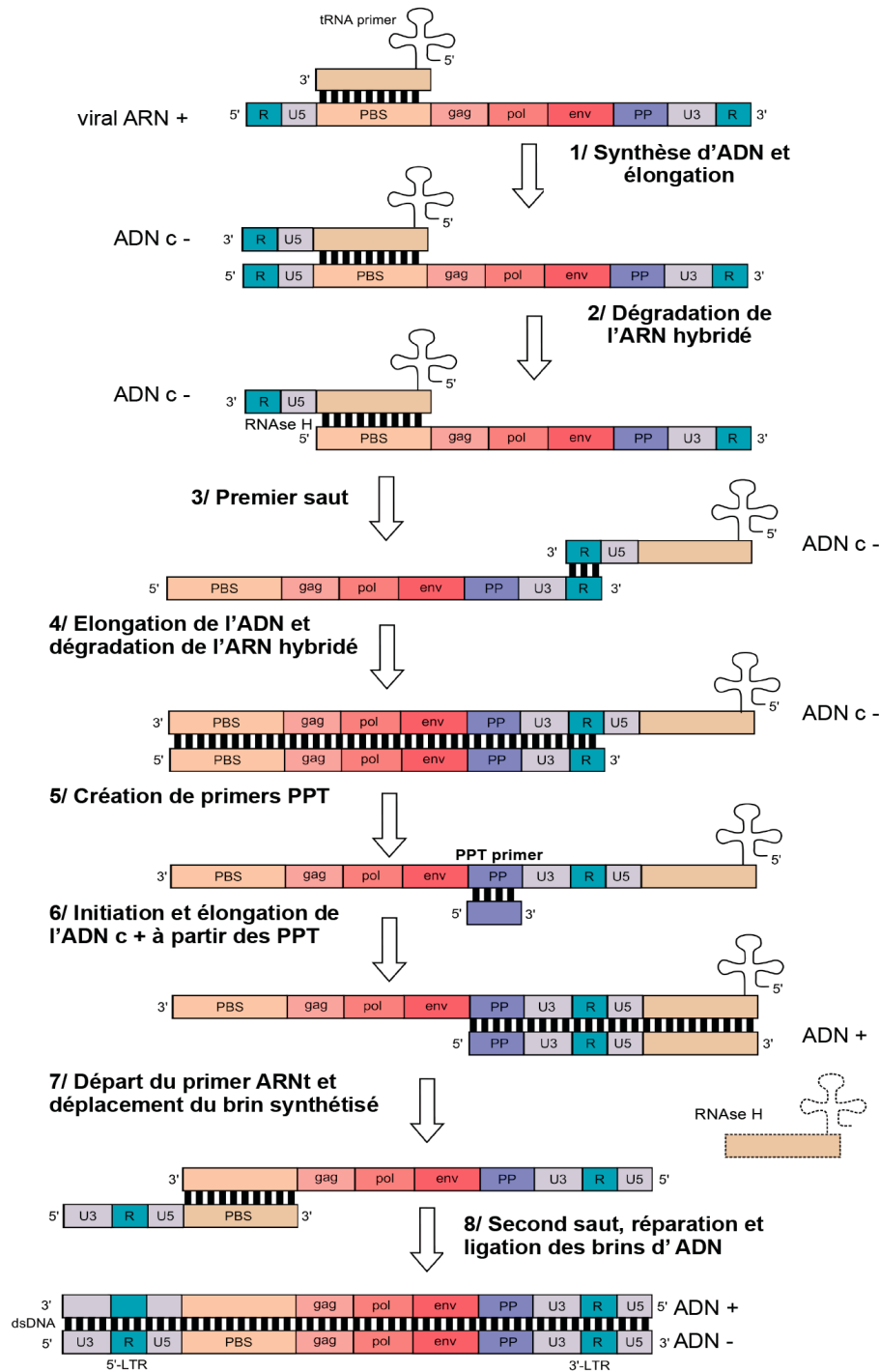


Figure 5 : Processus de reverse transcription du génome du virus de l'immunodéficience humaine.

La transcriptase inverse n'a pas d'activité correctrice. C'est ainsi que de nombreuses mutations génomique ont lieu au cours de la transcription (environ 3.10^{-5} erreurs par cycle de réplication) (45). Ces dernières, permettent au VIH d'échapper aux anticorps neutralisants et aux CD8 cytotoxiques. Après décapsidation près des pores nucléaires, l'ADN

bicaténaire résultant de la transcription inverse entre dans le noyau (figure 6). Cette étape fait intervenir i) la cyclophiline A, une protéine chaperonne qui participe à la déstabilisation des protéines de la capside (46), ii) la séquence de localisation nucléaire de la protéine de matrice et iii) la capacité de la protéine Vpr à lier les importines et nucléoporines (47). Une fois dans le noyau, l'ADN du VIH est intégré, par l'intégrase virale, au génome cellulaire pour former le provirus. Le VIH ne peut pas se répliquer dans les cellules quiescentes. Ainsi, en fonction du site d'intégration et de l'état d'activation de la cellule infectée, le provirus peut rester latent plusieurs années.

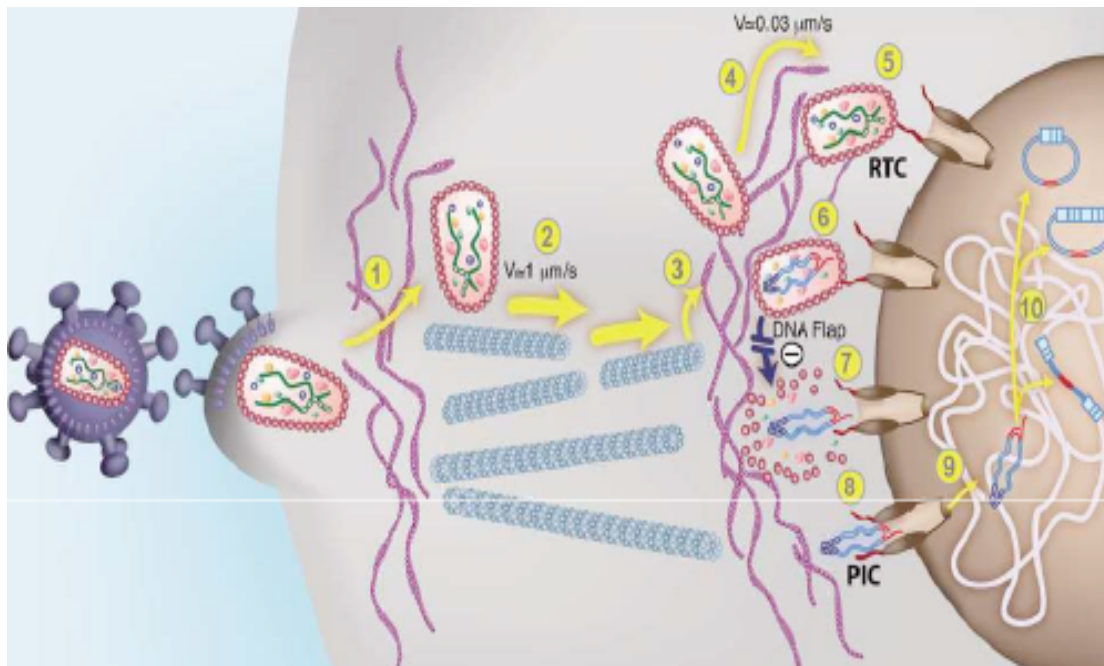


Figure 6 : Processus de décapsidation et transport intracellulaire du VIH (40). 1) Après fusion, le VIH interagit avec le réseau d'actine. 2) La particule, renfermant le complexe de RT, est dirigé par les microtubules vers le noyau. 3) Le complexe transite des microtubules vers les filaments d'actine à proximité du noyau. 4) Ces filaments permettent un mouvement lent vers la membrane nucléaire. 5) La nucléocapside (NC) s'arrête aux pores nucléaires où 6) la transcription inverse se déroule. 7) Le PIC dépourvu du Flap, s'accumule dans la NC intacte. 8) Le Flap permet de passer au travers du pore nucléaire. 9) L'ADN viral s'intègre à la chromatine de l'hôte mais peut aussi rester libre sous 1 ou 2 LTR circulaire.

- Transcription, traduction, assemblage et libération des virions

Suite à l'activation des cellules, la transcription virale a lieu consécutivement au recrutement de l'ARN pol II cellulaire au niveau du LTR, en 5' du provirus. Cependant, l'initiation et l'élongation efficace du transcrit nécessitent la formation d'une structure tige-

boucle appelée «Tat Associated Region» (TAR) sur laquelle se lie la protéine Tat (48). Lorsque la protéine Tat est absente, l'initiation de la transcription peut être initiée mais l'élongation est avortée et/ou inefficace. La protéine Rev permet ensuite d'exporter les ARNm mono ou non épissés vers le cytoplasme où ils pourront être traduits par la machinerie cellulaire en protéines virales. Une fois assemblés, les virions néosynthétisés sont libérés par bourgeonnement à partir de la membrane plasmique. Après bourgeonnement, les protéines précurseurs Pr55gag et Pr160gag-pol subissent un clivage rendant ainsi le virion infectieux.

A. 2 La pathogénèse de l'infection par le VIH

L'infection par le VIH peut être divisée en 3 phases : les stades I, II/III et le stade SIDA qui seront détaillés, illustrés et résumés dans cette partie (figure 7).

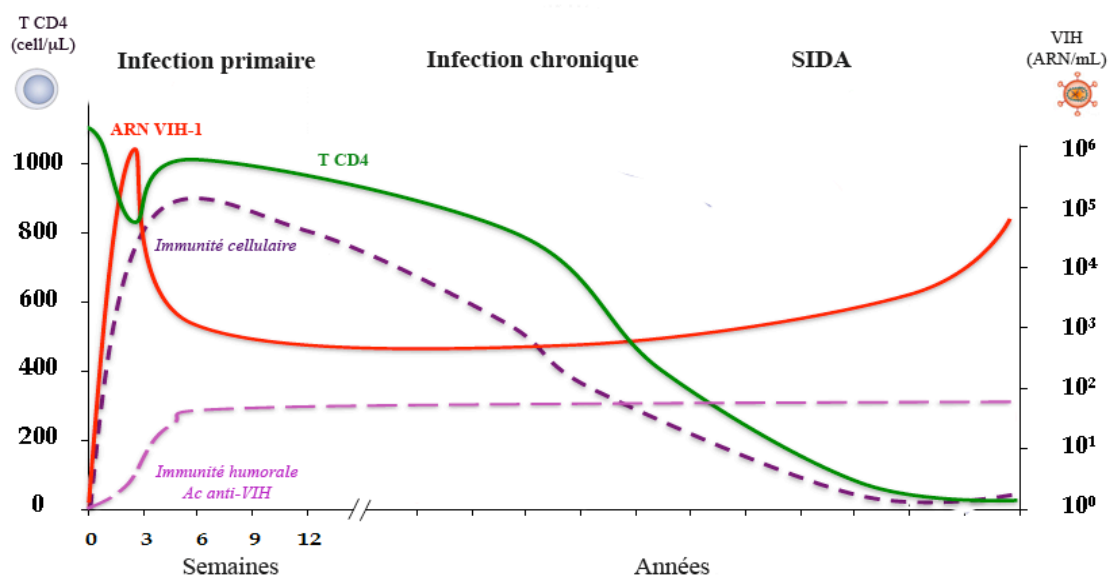


Figure 7 : Stades de la maladie associés à l'infection par le VIH (modifié du Fields 2007)

A. 2-a Le stade I : la primo-infection

Au cours du stade I ou primo-infection, le virus R5-tropique, se réplique fortement (10^6 - 10^8 copies d'ARN/mL de plasma) et cause en quelques jours une leucopénie importante (49-51). Les patients infectés présentent des symptômes rappelant une grippe ou une mononucléose. L'organisme arrive au bout de 4 à 6 semaines, à contenir en partie le virus en

induisant une immunité cellulaire puis humorale. En effet, *in vivo* une réponse cytotoxique CD8 est observée et permet de contrôler la réplication virale dans les T CD4 (52). Une réponse humorale est ensuite détectée et permet de mettre en évidence la séropositivité des patients. Divers travaux se sont penchés sur la capacité des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) à reconnaître puis s'activer et induire une réponse destinée à éliminer les cellules infectées *in vitro*. Ainsi, des études démontrent la capacité des monocytes et DC plasmacytoïdes (pDC) à reconnaître l'ARN simple brin du VIH par les TLR7/8 endosomaux suite à l'entrée du virus dans les cellules (53). Cette dernière est d'autant plus importante qu'elle active les CPA et conduit à l'activation des NK et T CD8. Les NK et les T CD8 activés inhibent la réplication des virus R5 (53-55). Le génome du VIH peut aussi être reconnu après la pénétration dans les cellules. Plus précisément, c'est au cours de la réplication virale que l'ARN double brin du VIH est reconnu par le TLR3 des DC myéloïdes (mDC). La reconnaissance du VIH par ces récepteurs de l'immunité innée, active la maturation des DC et conduit à l'activation des CD8. Ces T CD8 sont ensuite capables d'éliminer spécifiquement les cellules infectées par leur activité cytotoxique (53-58). Au cours de cette phase on note une importante production de cytokines faisant suite à la reconnaissance du VIH par le système immunitaire. Cette activation exacerbée du système immunitaire serait une étape clef de l'évolution de la maladie vers le stade SIDA.

A. 2-b Les Stades II/III: la phase chronique

Malgré ces réponses immunes décrites *in vitro*, le système immunitaire ne parvient pas à éliminer définitivement le VIH. *In vivo*, les patients infectés évoluent alors vers un second stade correspondant à une infection latente/chronique. Cette latence peut s'étaler sur une dizaine d'années. Dans ce stade asymptomatique, le virus développe des mécanismes d'échappement au système immunitaire et continue de se répliquer au niveau des organes lymphoïdes secondaires et du tissu gastro-intestinal lymphatique (GALT). Cette réplication, forte et chronique, conduit à une hyperactivation du système immunitaire mais aussi à la perte progressive du nombre et des fonctions des T CD4. Ceci coïncide avec l'apparition des souches R5X4 et X4 tropiques. La diminution du nombre de ces cellules, peut être induite par le virus lui-même, suite à l'activation des programmes de mort cellulaire (59) tels que TRAIL, Fas/FasL et à l'inhibition de l'hématopoïèse (60) mais peut aussi être induite par les T CD8 et les NK activés.

La déplétion des T CD4 serait localisée principalement au niveau gastro-intestinal. Dans ce compartiment, la déplétion rapide et sévère des T CD4 débiterait dès la phase aigüe. Plus

particulièrement, il apparaît une forte déplétion des Th17 impliqués dans l'immunité mucoale (61). En effet, des études montrent que les patients infectés au stade chronique présentent 10 fois moins de Th17 que les individus contrôles. Des observations similaires ont été réalisées dans le modèle macaque Rhésus (62). La perte de lymphocytes au niveau gastro-intestinal est généralement accompagnée d'une apoptose des cellules épithéliales intestinales et d'une altération de la perméabilité et des jonctions cellulaires (63-65). Ceci est dû, à l'hyperactivation du système immunitaire. Notamment à la forte production de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-13 (63) et aussi à l'activité de protéines virales telles que la gp120 et la protéine Tat (66-68). Ces phénomènes d'inflammation et d'activation chronique ont pour conséquences la destruction de la barrière gastro-intestinale et la translocation de produits microbiens au niveau systémique. La translocation microbienne est associée à une dérégulation du réseau de cytokines et de chimiokines. Ainsi, les bactéries entrant en contact avec les cellules de l'immunité contribuent à maintenir l'inflammation et l'hyperactivation du système immunitaire conduisant à l'affaiblissement de ce dernier. L'hyperactivation du système immunitaire est aussi importante puisque utilisée comme un indicateur de la progression de la maladie vers la phase SIDA. En effet, l'équipe de Brechley démontre une corrélation positive entre le taux sérique de LPS, l'activation du système immunitaire et l'évolution de la maladie vers la phase SIDA (69, 70). Ceci fut également confirmé dans des travaux comparatifs entre le sooty mangabey (hôte naturel du SIV) et le macaque Rhésus (70, 71). Dans ces études, ces deux primates présentent une charge virale identique tout au long de l'infection. Cependant, il apparaît clairement que les singes sooty mangabey, qui ne développent pas la maladie, contrôlent plus rapidement l'activation du système immunitaire comparativement aux macaques Rhésus. Ces derniers présentent eux, un emballement du système immunitaire. Récemment, il a été montré que les monocytes des singes sooty mangabey, produisent peu de TNF- α en réponse au LPS comparativement aux macaques (72). Les macaques produisant de fortes quantités de TNF- α développent alors une hyperactivation du système immunitaire. Cette étude confirme et souligne le rôle clef du TNF- α dans l'activation chronique et exacerbée du système immunitaire, responsable de l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. Les leçons tirées à partir des patients non progressifs et des hôtes naturels du SIV, les singes verts et sooty mangabey, soulignent l'importance du contrôle de l'hyperactivation du système immunitaire suite au passage de la phase aiguë à la phase chronique. Le rôle du TNF- α est d'autant plus important dans l'affaiblissement du système immunitaire, puisqu'il est accompagné d'une forte production d'IL-10, une cytokine

immunosuppressive, une diminution d'IL-2 et une anergie des lymphocytes T CD8. De nombreux travaux corrélient positivement la production d'IL-10 et de TNF- α avec l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. En effet, parmi les patients dits progressseurs lents, certains présentent un polymorphisme sur le gène de l'IL-10. Ce polymorphisme contribue à une plus faible production d'IL-10 et par conséquent permet aux patients atteints, d'évoluer moins rapidement vers le stade SIDA (73, 74). Dans ces conditions d'affaiblissement du système immunitaire, le VIH se réplique fortement, entraînant une perte plus importante des défenses de l'hôte. Ce faisant, l'hyperactivation suivit de l'affaiblissement du système immunitaire étant observées bien avant la phase SIDA (75), ils feraient certainement intervenir des facteurs cellulaires mais aussi viraux. L'un des candidats viraux serait la protéine Tat du VIH.

A. 2-c Le stade final : SIDA

Sans traitements antirétroviraux, l'organisme s'affaiblit. En effet, la perte de fonction et du nombre de CD4, la perte de production d'IL-2 et la perte d'activité des CD8 cytotoxiques conduit les patients vers une phase SIDA. Cette dernière est caractérisée par un seuil de CD4 fixé à moins de $200 \text{ L}_T \text{ CD4}^+/\mu\text{L}$ de sang. Lorsque ce seuil est franchit, les monocytes, DC et CD8 sont infectés ce qui augmente la charge virale et accentue l'affaiblissement du système immunitaire. A ce stade, le système immunitaire a perdu la bataille et l'organisme présente un environnement favorable aux développements d'infections opportunistes et de tumeurs (lymhome et sarcome de Kaposi).

B. 2 Mécanismes de persistance virale et de dérégulation du système immunitaire (SI) au cours de l'infection par le VIH

B. 1 La dérégulation du système immunitaire inné

Le système immunitaire inné se compose de nombreux acteurs cellulaires et humoraux qui coopèrent entre eux afin d'induire une première réponse efficace à l'élimination du pathogène. Ces acteurs incluent les cytokines, les protéines du complément, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules Natural Killer et les Lymphocytes $T\gamma\delta$ ($T\gamma\delta$). C'est ainsi que de nombreux virus dont le VIH, ont développé divers mécanismes d'échappement aux composants de la réponse innée.

B. 1-a Le complément

Dès l'entrée du virus dans la cellule, la gp120 et la gp41 activent le système du complément. Après la séroconversion, l'immunité adaptative est pleinement activée et conduit à la synthèse d'anticorps anti-VIH, l'activation accrue du complément et aux dépôts de fragments du complément sur les virions liés aux anticorps. On retrouve chez les patients infectés par le VIH, une accumulation de virus opsonisés tout au long de la phase aiguë et chronique de l'infection.

Au stade précoce, les virions associés au complément sont éliminés et neutralisés. A des stades tardifs, la lyse dépendant du complément (LDC) ne joue qu'un rôle mineur dans la réduction de la virémie (76, 77). Au contraire, ce système peut représenter un mécanisme de dissémination et de propagation du VIH. En effet, pendant le bourgeonnement, le VIH acquiert une membrane cellulaire chargée de nombreux récepteurs de régulation du complément tels que CD59 et CD55 (78) qui permettent de protéger le VIH de la lyse dépendante du complément. Les virions non éliminés, restent couverts de fragment C3. Ces virions circulants, interagissent avec les récepteurs aux compléments à la surface des lymphocytes B, macrophages, NK, DC ce qui promeut l'infection des cellules et la transmission virale. En outre, le complément seul ou par l'intermédiaire des DC est capable de modifier la production de cytokine et créer un environnement favorable à l'activation des T et à la présentation antigénique (79, 80). Aussi, la liaison du C3d opsonisé sur le VIH, aux CR2 sur les cellules dendritiques folliculaires (DCF) des centres germinatifs contribue à favoriser la création de réservoir viraux chez les individus infectés (81, 82).

En résumé, les interactions VIH-complément sont très complexes et contribuent, dans la phase aiguë de l'infection, à la réduction de la charge virale par la lyse ou la neutralisation par l'opsonisation. Lors de la phase chronique, le complément contribue à la propagation du virus suite à l'attachement aux récepteurs aux compléments sur les cellules.

B. 1-b Les Interférons (IFN) et les cytokines

Au cours de la phase aiguë de l'infection, on observe en plus d'une forte réplication virale et de la perte des T CD4, une forte production de cytokines pro et anti-inflammatoires. Récemment, les productions plasmatiques de cytokines et chimiokines au cours de la phase aiguë de l'infection par le VIH ont été décrites (83, 84) (figure 8). Notamment, on remarque :

- une augmentation rapide et transitoire de la production d' IFN- α et d'IL-15 suivi par une forte augmentation en IP-10,

- une augmentation rapide et soutenue de TNF- α et de MCP-1,
- une production plus lente de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et l'IFN- γ ,
- et une forte augmentation de la production d' IL-10 immunorégulatrice.

Toutes ces cytokines sont produites majoritairement par les DC et les monocytes/macrophages. En effet, les pDC sont la source majeure d'IFN- α produit au cours d'une infection virale. Des études *in vitro* ont montré que suite à l'endocytose du VIH les pDC produisaient un grand nombre de cytokines comme l'IFN- α . En parallèle, les DC myéloïdes produisent l'IL-15 et le TNF- α (56). Ces DC myéloïdes en collaboration avec les monocytes/macrophages sont aussi responsables de la production lente, continue et prolongée d' IL-6, d'IL-8, d'IL-12, d'IL-18, de TNF- α et d'IL-10.

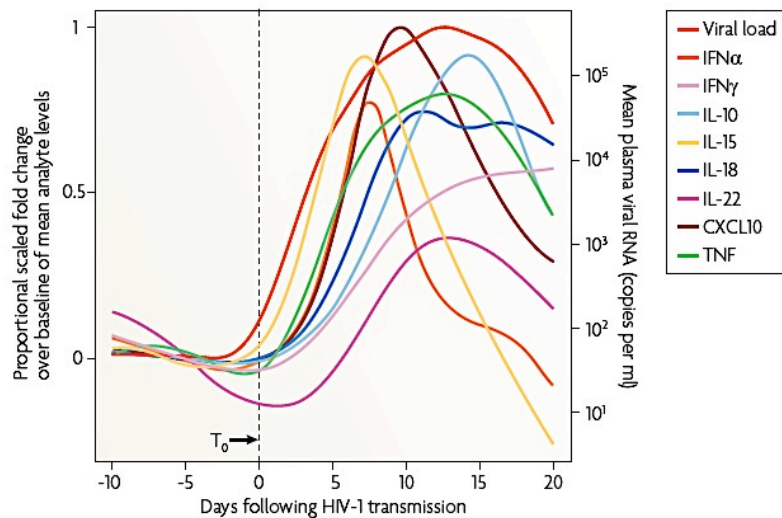


Figure 8 : La dérégulation du réseau de cytokines au cours de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1 (83). Les cinétiques relatives de production plasmatique des protéines, cytokines et chimiokines pendant la phase aiguë de l'infection par le VIH-1. La première ligne de cytokines produite correspond à l'IL-15 et l'IFN- α suivie par une seconde production de TNF- α , d' IL-18, d'IL-10 et de CXCL10.

- Les Interférons (IFN)

Les IFN sont des acteurs majeurs de l'immunité innée. Les IFN α/β ont une activité antivirale puissante à la fois sur les cellules infectées et les cellules non-infectées (85). Elles inhibent la réplication virale et en parallèle activent les NK, les macrophages et la présentation antigénique aux L γ . L'IFN- α/β induit la maturation des DC et la sécrétion de diverses cytokines telles que l'IFN- α/β , le TNF- α et l'IL-6 (86). Lorsque l'IFN- α est produite, elle inhibe la réplication du VIH dans les premières étapes, mais aussi l'expression des gènes

viriaux, l'assemblage et le bourgeonnement du VIH. Le VIH-1 active la sécrétion d'IFN- α par les pDC suite à sa reconnaissance par les TLR7/TLR8 ou TLR9 (53, 56, 71, 87, 88). L' IFN- α permet alors d' activer l'expression de nombreux gènes inductibles aux IFN (ISG). Ces ISG favorisent la prolifération des cellules immunitaires et induit un état antiviral dans les cellules en induisant entre autre une cytidine déaminase : APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G). Cependant, le VIH a mis en place un système d'échappement à APOBEC3G, notamment par l'intermédiaire de sa protéine Vif (89, 90). L'IFN- α peut aussi agir en inhibant l'entrée et la réplication du VIH. Toutefois, il apparaît que l'IFN- γ , lui, active la réplication du VIH dans les cellules chroniquement infectées (91).

Ainsi au cours de l'infection aiguë, les IFN jouent un rôle protecteur permettant l'élimination et/ou la neutralisation du VIH. Or au stade chronique, l'activation répétée et forte du système immunitaire induit une inflammation chronique conduisant à l'apoptose des cellules, la destruction de la barrière gastro-intestinale, la dérégulation du réseau de cytokines et l'affaiblissement du système immunitaire. C'est ainsi que la production d'IFN de type I au cours de la phase chronique est utilisé comme un indice majeur de la progression de la maladie vers la phase SIDA.

- Le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et l' Interleukine-6 (IL-6)

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire produite par les NK, L_T , L_B , monocytes/macrophages et les neutrophiles. Deux récepteurs ont été décrits pour le TNF- α , le TNFR1 et le TNFR2, et régulent la survie et l'apoptose des cellules cibles (92). Dans l'infection par le VIH, le TNF- α est une molécule clef impliquée à la fois dans l'infection, la propagation du virus mais aussi dans l'évolution de la maladie et la pathogénèse associée à l'infection par le VIH (figure 9).

Des études ont montré que l'interaction TNF- α /TNFR2 déclenche la synthèse de GM-CSF qui bloque l'entrée du virus dans les macrophages (93). Cependant, il a été montré que l'interaction du TNF- α avec le TNFR1 active le facteur de transcription NF- κ B qui augmente de manière significative la réplication du VIH-1 dans les macrophages (94-96). Cet effet est d'autant plus important qu'il est potentialisé et amplifié par la synthèse d'IFN- γ et la synthèse autocrine de TNF- α (97). Le TNF- α contribue aussi à la progression de la maladie par sa capacité à induire l'apoptose des cellules T. L'apoptose des T CD4 pourrait être induite par la liaison TNF- α /TNFR1, alors que l'apoptose des T CD8 serait induite principalement par la liaison TNF- α /TNFR2 (98). De plus, le TNF- α est toxique pour les

neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (92). Ainsi, une production continue et forte de cytokines pro-inflammatoires contribue à la destruction de la barrière hémato-encéphalique et le $\text{TNF-}\alpha$, dans le SNC, conduit à la neurotoxicité. Cette dernière est responsable de désordres neurologiques importants à l'origine de la démence associée à l'infection par le VIH.

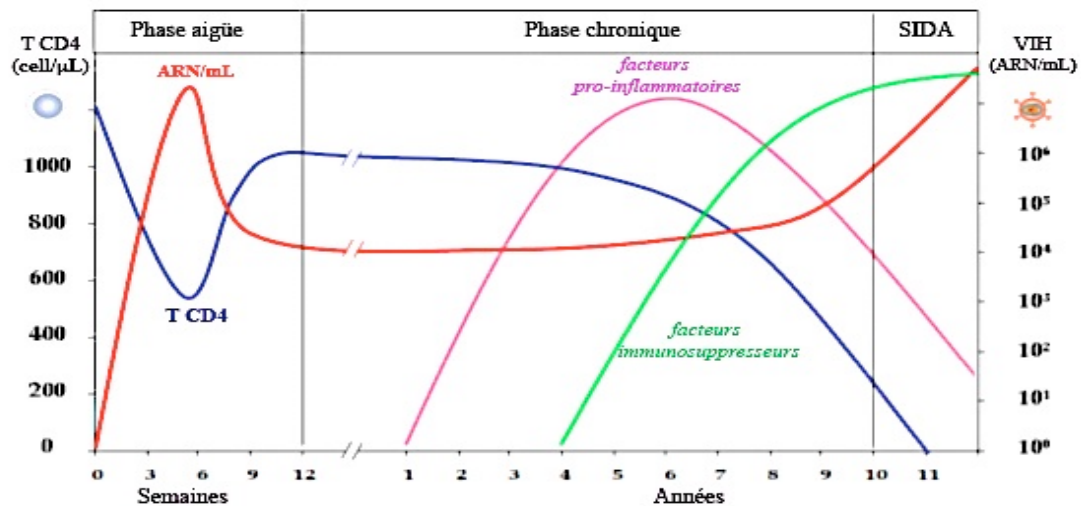


Figure 9 : Evolution du nombre de lymphocytes T CD4 et de la charge virale au cours des différents stades de l'infection par le VIH. Représentation schématique de la relation entre le nombre des cellules T par microlitre sang (ligne bleue) et la virémie (copies d'ARN_{VIH} / mL sang) (ligne rouge) au cours du temps d'infection. Deux mécanismes majeurs impliqués dans le dysfonctionnement des T et la progression de la maladie vers la phase SIDA sont représentés (unités arbitraires) tels que l'augmentation des facteurs pro-inflammatoires $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IFN- α (ligne rose), et la régulation positive des facteurs immunosuppresseurs comme l'IL-10, PD-1, PDL-1 et IDO (ligne verte).

Tout comme le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire. Elle est produite par les macrophages, DC, L_T et les cellules B en réponse à des infections bactériennes et virales. L'IL-6 a pour rôle de stimuler les cellules B, d'activer la différenciation des monocytes et des T producteurs d'IL-4 (99). Au cours de l'infection virale, l'IL-6 augmente la réplication du VIH-1 dans les macrophages et les lignées U1 (lignée promonocytaire chroniquement infectée par le VIH-1) et améliore la production de $\text{TNF-}\alpha$ (100) (figure 9).

- L'Interleukine -10 (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire produite par les DC, les T activés, les cellules B et les monocytes/macrophages. La production d'IL-10 a pour effet d'inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et le $\text{TNF-}\alpha$, d'inhiber l'activation des cellules immunitaires et d'induire l'anergie des CPA et cellules T par

l'expression du système régulateur PD1/PD1L. De plus, l'IL-10 contribue à activer la cytotoxicité des NK et des lymphocytes T CD8.

Dès le stade asymptomatique, on remarque une augmentation progressive d'IL-10 sérique qui interfère avec l'infection virale chez les patients VIH⁺ (74, 101-103) (figures 8 et 9). L'IL-10 agit sur 2 niveaux: i) la réplication virale et ii) l'inhibition des réponses T.

Tout d'abord, des travaux ont montré l'implication de l'IL-10 dans l'inhibition de la réplication du VIH. En effet, le prétraitement des monocytes avec l'IL-10 diminue significativement l'expression des ARN viraux et inhibe la réplication du VIH (94, 104). De plus, des expériences de co-cultures ont montré que l'IL-10 inhibe la réplication des souches X4 lorsque les macrophages sont co-cultivés avec des L_T. Dans le cas où la co-culture est composée de lymphocytes et cellules dendritiques, l'IL-10 augmente la réplication virale (105). Ces travaux suggèrent ainsi un rôle de l'IL-10 dans l'émergence des souches X4 du VIH-1 au cours de l'infection. L'IL-10 a aussi été rapporté comme pouvant contribuer à augmenter l'infection des monocytes par le VIH en favorisant l'expression des CCR1, CCR2 et CCR5 (106).

L'IL-10 est aussi associée, dès le stade asymptomatique, à un dysfonctionnement du système immunitaire, en inhibant notamment la prolifération des T CD4. Les travaux de Clerici et al., ont montré que les CD4 des patients au stade asymptomatique perdent progressivement la capacité à proliférer (107). Cette inhibition et anergie des cellules T est due à la production importante d'IL-10 par les monocytes/macrophages (108, 109). Plus précisément, il a été montré que l'IL-10 augmente l'expression de PD1 et PD1L sur les monocytes et L_T. Cette augmentation de PD1/PD1L est corrélée positivement avec la perte des L_T et l'évolution de la maladie vers la phase SIDA (figure 9). Des études réalisées dans le modèle macaque Rhésus et le singe sooty mangabey confirment l'importance de l'IL-10 et du système PD1/PD1L dans l'évolution de la maladie vers la phase SIDA (110, 111). En effet, le singe sooty mangabey, hôte naturel du SIV qui ne développe pas le stade SIDA, exprime très précocement le système PD1/PD1L au cours de l'infection. Comparativement, le macaque Rhésus qui développe le SIDA, n'exprime ce système que très tardivement au cours de la phase chronique. En d'autres termes, l'expression très précoce de l'IL-10 et du système PD1/PD1L permet d'inhiber l'hyperactivation du système immunitaire et donc l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. L'importance de l'IL-10 dans l'infection au VIH a également été analysée et confirmée chez l'homme. En effet, les patients qui présentent un polymorphisme sur le gène de l'IL-10 progressent moins rapidement vers le stade SIDA. De plus, chez les patients dits non progressseurs on retrouve une très faible concentration d'IL-10 sérique (112, 113). Cette production est aussi significativement réduite chez les patients

sous trithérapie (74, 114). Le rôle crucial de l'IL-10 dans l'évolution de l'infection par le VIH-1 est d'autant plus important qu'elle favorise le développement de réservoirs viraux et la persistance du VIH.

Au vu du rôle important de ces cytokines dans l'activation et la régulation du système immunitaire, il apparaît clair que de nombreux virus ont pour intérêt d'induire ces molécules afin de se disséminer et de persister. C'est ainsi que le VIH a mis en place, par l'intermédiaire de ses protéines virales, des mécanismes permettant d'induire ces cytokines et déréguler le réseau cytokinique. Notamment, les gp41 et gp120 induisent une rapide augmentation de la production d'IL-10 et de TNF- α par les monocytes et pas les cellules T, B ou NK (115-117). La protéine Nef et Tat sont aussi responsables de la production d'IL-10 et/ou de TNF- α et d'IL-6 dans les monocytes (118-120).

B. 1-c Les cellules immunitaires innées

Au cours de la primo-infection, les virus R5-tropiques sont capturés par les cellules puis transférés aux cellules cibles exprimant CCR5. Ainsi, le VIH-1 traverse la muqueuse par fixation ou infection des DC, transcytose ou infection des macrophages. Diverses cellules composent le système immunitaire inné telles que les DC, les NK, les macrophages et représentent la première ligne de défense contre le VIH.

- Les cellules dendritiques (DC)

Les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) qui peuvent être divisées en plusieurs types. On retrouve les DC classiques myéloïdes (cellules de Langerhans, DC dermiques) et les DC plasmacytoïdes. Ces deux classes de DC diffèrent en fonction de leurs localisations, leurs expressions de lectines de type C et de Toll Like Receptor (TLR). Les rôles de chaque type de DC dans l'infection au VIH, la production de cytokines et la pathogénèse associée au VIH sont résumés dans le Tableau 1. Récemment, il a été montré que l'épuisement des mDC et pDC de la circulation, se produit dès la phase asymptomatique de l'infection par le VIH (121). Cet épuisement des DC de la circulation est dû à leurs redistributions vers les organes lymphoïdes suite à l'expression de CCR7. Ainsi, la restauration des DC circulantes représente une étape clef dans la réponse immunitaire contre le VIH.

Tableau 1 : Récapitulatif des diverses DC et de leurs fonctions dans l'infection par le VIH

	DC conventionnelles (CD11c+HLA-DR+)		DC plasmacytoïdes (CD123+ HLA-DR+)
	Cellules de Langerhans	DC dermique CD103 ⁻ CD103 ⁺	
Localisation	Épithélium stratifié	Derme	- Sang et organes lymphoïdes secondaires - Tissus périphériques
Lectine de type C	Langerine	DC-SIGN Langerine	BDCA-2
Expression TLR	TLR2, 3, 5	TLR2, 3, 4, 5	TLR7, 8, 9
Rôle dans l'infection VIH	Dégradation des granules de Birbeck	Transfert Inconnus du VIH	- Production IFN et apoptose des T - Induction des Treg par l'expression d'IDO - Recrutement des T aux sites d'infections => propagation du VIH
Cytokines produites	IL-1 β , -6, -8, -12, -15, -23	IL-1 β , -2, -8, -12, -15, -23	IFN- α/β , IL-2, TNF
Fonctions	- Activation Ag spécifiques des T et B - Activation des NK par l'IL-12		- Induction des Treg - Activation des NK par IFN

- Les monocytes/macrophages

Au cours de l'infection par le VIH, les monocytes/macrophages sont parmi les premières cellules rencontrées par le virus. Le virus présent dans les monocytes/macrophages peut être libéré par ces derniers dans un compartiment différent.

Ceci contribue alors à la persistance et à la propagation du virus au travers l'organisme (122-126). Par exemple le VIH peut se retrouver dans le cerveau (123, 127). En effet, le VIH et le SIV peuvent entrer dans le système nerveux central (SNC) par l'intermédiaire des monocytes/macrophages. Ce phénomène joue un rôle crucial dans la neuropathogénèse de l'infection et contribue à la production de cytokines pro-inflammatoires et neurotoxines dans le SNC, responsables de la démence (127). Les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires perturbent l'homéostasie de la barrière hémato-encéphalique ce qui entraîne sa destruction et facilite l'entrée des monocytes dans le cerveau (125, 126). En particulier, CCL2, principalement sécrétée par les monocytes/macrophages, initie la migration des cellules T et monocytes dans le SNC. Ceci conduit à la mort des cellules neuronales au cours de l'infection par le VIH et le SIV (128, 129). La production de ces cytokines par les monocytes/macrophages se fait principalement par la protéine virale Tat (130).

Aussi, le VIH, une fois internalisé par les macrophages, peut s'accumuler dans des corps multivésiculaires intracellulaires. Ces derniers facilitent l'assemblage et l'échappement du virus au système immunitaire (131). Une fois la synapse virologique formée entre un macrophage et une cellule T, le virus peut être efficacement transmis aux lymphocytes T. Le macrophage tissulaire agit alors comme un «cheval de Troie», qui cache le virus au système immunitaire avant de le diffuser. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré une altération de la fonction des macrophages par le VIH-1. En effet, les macrophages de personnes VIH⁺ présentent un défaut de phagocytose. Récemment, il a été montré que c'est la protéine virale Nef qui est responsable de ce défaut (132).

Le VIH, par ses protéines accessoires, est aussi capable de modifier les réponses immunitaires induites par les macrophages (133, 134) et promouvoir la réplication virale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (134-136). De plus, la production d'IFN, de cytokines et chimiokines NF- κ B dépendante, permet le recrutement des CD4 et des macrophages aux sites d'infection ce qui favoriserait la propagation du VIH (137-139).

Ainsi, les monocytes/macrophages représentent un réservoir important du VIH permettant d'expliquer la persistance du virus. Néanmoins, le VIH affecte de façon forte plusieurs fonctions des monocytes/macrophages dont le : chimiotactisme, la phagocytose, le stress oxydatif, la présentation des antigènes et la production de cytokines. Par conséquent, le VIH en agissant sur ces cellules clefs du système immunitaire, échappe aux réponses immunitaires et se dissémine au travers de l'organisme.

- Les cellules Natural Killer (NK)

Les NK sont des cellules qui circulent dans le sang et la rate et sont activées par l'IFN de type I. Ces NK n'expriment pas de TCR, sont CD3 négative, produisent des quantités élevées de cytokines et chimiokines telles que MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α , GM-CSF ou l'IFN- γ et possèdent une activité cytotoxique perforine/granzyme (140-144). Chez les individus infectés par le VIH, on remarque un défaut dans la réponse cytotoxique et la sécrétion de MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES par les NK (145-147). Le défaut de fonction des NK se manifeste dès le début de l'infection. Elle peut être attribuée à plusieurs facteurs notamment : i) la diminution des stocks intracellulaires de perforine/granzyme (148); ii) la régulation de l'expression des récepteurs inhibiteurs des NK. De plus, il apparaît au cours de la phase chronique et de la dérégulation du réseau de cytokine, une activation inappropriée des NK périphériques conduisant à l'épuisement ou à l'anergie des NK (149, 150).

- Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les cellules T $\gamma\delta$ sont principalement situées dans la muqueuse gastro-intestinale. Ils jouent un rôle essentiel dans la défense contre les agents pathogènes comme le virus de l'herpès simplex, le virus Epstein-Barr et le VIH-1 (151). En effet, des études de co-culture de cellules T $\gamma\delta$ avec des lymphocytes T infectés, conduit à la lyse des cellules infectées et la production de facteurs réprimant l'infection au VIH-1 (152, 153). Dès la phase aiguë, l'infection par le VIH-1 est accompagnée de nombreux changements et perturbation des T $\gamma\delta$, qui persistent tout au long de l'infection. Les facteurs impliqués dans ces changements restent à étudier.

B. 2 La dérégulation du système immunitaire adaptatif

Dès la primo-infection, une dérégulation de la production de cytokines est observée et conduit à l'évolution de la maladie. Cette dérégulation du réseau de cytokines est importante puisqu'elle participe activement à la physiopathologie de l'infection en agissant sur la réplication virale, l'inactivation du système immunitaire, l'induction de l'apoptose et la neurotoxicité. Il a été montré que les individus dits non-progresseurs, qui contrôlent efficacement la virémie grâce à une réponse immune, présentent un équilibre des réponses Th1/Th2 (154). Ainsi, l'évolution de l'infection vers le stade SIDA est strictement associée à la

dérégulation de la balance Th1/Th2 (figure 10).

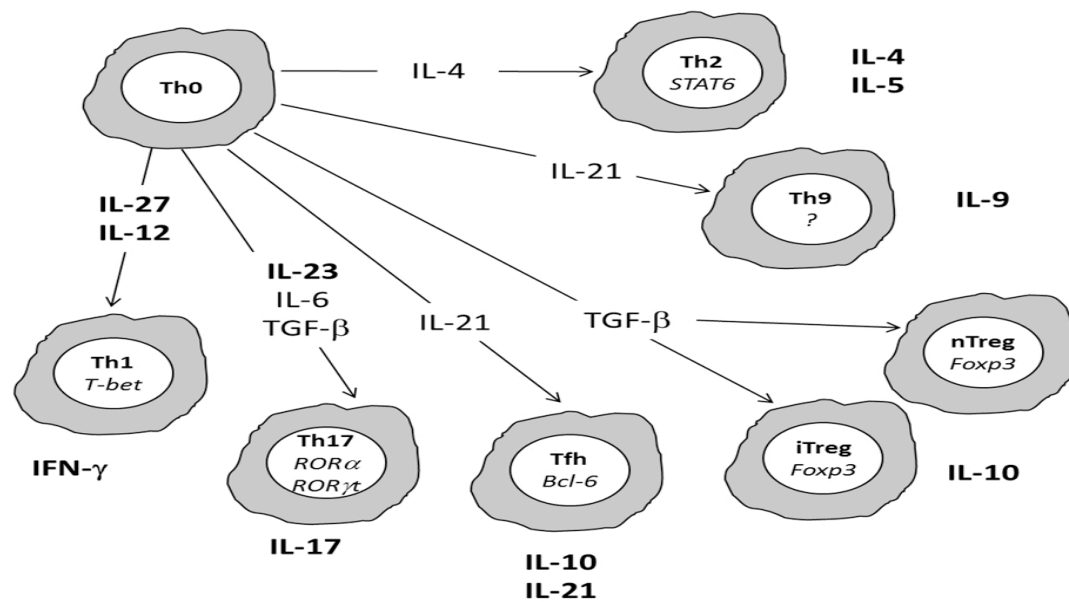


Figure 10. Les voies de différenciation des lymphocytes T. Les T naïfs (Th0), peuvent se différencier en différents sous-ensembles en fonction des cytokines présentes dans l'environnement. Les facteurs de transcription caractéristiques de chaque type cellulaire (en italique) et les cytokines produites (en gras) sont représentés ci-dessus.

En effet, chez les patients infectés, il a été observé dès le stade asymptomatique, une diminution de la synthèse d'IL-12 et une forte production d'IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et de TNF-α (75, 155). Chez ces patients, la réponse est orientée vers un profil Th2 inefficace à l'élimination du virus. D'autres travaux semblent privilégier une transition vers un profil Th0 lors de l'évolution de l'infection vers le stade SIDA. Les Th0 secrètent à la fois l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN-γ. Une étude réalisée chez l'homme a montré que seule la synthèse de l'IL-10 et du TNF-α est augmentée, sept jours seulement après l'apparition de la virémie au cours de l'infection aiguë (156). Ces cytokines seraient alors des molécules clefs, induites entre autres par Tat, dans l'inhibition et la perturbation de la réponse Th1 et resteraient des molécules essentielles à la progression de l'infection et à la pathogenèse du VIH.

B. 2-a L'IL-12 et l'IL-27 deux cytokines Th1 inhibées au cours de l'infection

L'IL-12 active est un dimère composé de l'IL-12p35 et IL-12p40. Elle est sécrétée par les monocytes/macrophages et les DC. L'IL-12 permet de différencier les lymphocytes T en lymphocyte de type Th1 et est responsable de l'induction d'IFN-γ. Chez les patients VIH⁺, on remarque un défaut de production de l'IL-12 (157-160) et un défaut d'expression de son

récepteur (161). Des études *in vitro* montrent que le traitement des cellules T de patients infectés avec de l'IL-12 recombinante améliore les réponses immunes contre le virus (162). De façon intéressante, des études de vaccinologie basées sur l'utilisation de vecteurs exprimant l'IL-12 ont présenté un fort succès dans les modèles animaux (163, 164). L'immunisation de souris Wt et IL-12 KO avec un vecteur codant la gp120 a permis de mettre en évidence un rôle essentiel de l'IL-12 dans la réponse T cytotoxique contre la gp. En outre, la reconstitution en IL-12 des souris déficientes permet de restaurer la réponse T (165, 166). Cependant, la toxicité de l'IL-12 reste un sujet de préoccupation.

L'IL-27 a été découverte en 2002 par Pflanz et al. comme un nouveau membre de la famille des cytokines IL-12 (167, 168), possédant des propriétés pro-et anti-inflammatoires. Elle régule la fonction des monocytes/macrophages (169, 170), l'activation des T naïfs et leurs différenciation en Th1. L'IL-27 contrôle la réplication du VIH en induisant divers gènes inductibles aux IFN (171). Peu d'études ont décrit comment le VIH affecte l'IL-27. La première étude a consisté à examiner l'impact de l'infection par le VIH sur l'expression de l'IL-27 circulante. L'équipe de Guzzo et al. 2010, ont ainsi observé une corrélation négative entre l'IL-27 et la charge virale, qui suggère que le VIH inhibe l'expression de l'IL-27.

B. 2-b Les lymphocytes Th17

Les Th17 jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité mucoale. Ils sont retrouvés dans le tractus gastro-intestinal (62) et limitent la translocation microbienne au niveau systémique en augmentant l'expression de peptides antimicrobiens et en mobilisant les neutrophiles aux sites infectés. Le GALT est un important réservoir de cellules T CD4 et une source de Th17. C'est aussi un site clef de la réplication du VIH et par conséquent de la perte des T CD4 (172, 173). Aussi bien au cours des infections par le SIV chez les macaques Rhésus, que par le VIH chez l'homme, on observe une perte rapide et significative des Th17 au niveau du GALT. Cette perte a pour conséquence la translocation microbienne (172, 174) et une inflammation des muqueuses (175). C'est ainsi que de nombreuses études ont montré une corrélation positive avec les concentrations plasmatiques de LPS et l'évolution de la maladie vers la phase SIDA (176-178).

Chez les patients VIH⁺, on observe un défaut de production d'IL-17 associé à une virémie élevée (179). En 2008, Macal et al. ont montré qu'une restauration des cellules CD4 (> 50%) pouvait être atteinte et être associée aux Th17 (180). De plus, des études réalisées chez les macaques Rhésus, ont permis de constater que la perte de Th17 au niveau mucoale prédit la progression de la maladie vers la phase SIDA (181). Ces expériences suggèrent

l'importance de l'IL-17 et des Th17 dans le contrôle de l'infection et la restauration des cellules T. De façon intéressante, une étude *in vivo* a montré que le virus R5-tropique cible préférentiellement les Th17 CCR6⁺ CCR5⁺ (182). Les T fortement permissifs à la réplication du VIH sont les cellules T exprimant CCR4⁺ CCR6⁺ et CXCR3⁺ CCR6⁺. Ces dernières expriment des cytokines et des facteurs de transcription spécifiques des Th17 et Th1/Th17 respectivement. Au cours de l'infection par le VIH/SIV, il a été constaté un épuisement des cellules Th17 dès les premières semaines de l'infection. Bien qu'il n'y ait pas suffisamment de preuves pour affirmer que les Th17 sont importants dans l'évolution de l'infection par le VIH, il est encore difficile de savoir comment les Th17 et l'IL-17 sont régulés lors de l'infection par le VIH.

B. 2-c Les lymphocytes Treg

Les Treg ont pour rôle de réprimer et contrôler l'activation immunitaire. Elles sont définies comme des cellules CD4⁺, CD25⁺ et Foxp3⁺. Dans l'infection au VIH, les Treg ont un effet protecteur en inhibant à la fois l'infection des T CD4 conventionnels et l'activité cytotoxique des T CD8 (183, 184). Les Tregs peuvent être infectés par le VIH et plus particulièrement par les virus X4 (185). Le virus peut aussi se lier aux Treg *via* l'interaction gp120/CD4. Cette interaction a pour conséquences d'augmenter l'activité suppressive des Treg, leurs survies et leurs migrations vers les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes (186, 187). L'infection par le VIH est associée à une augmentation de la fréquence relative des Treg dans les CD4 et une diminution de leur nombre absolu (188). Fait intéressant, une étude menée par Weiss et al. en 2010, a démontré que les Treg sont en mesure de contrôler l'activation immunitaire chez les patients sous antirétroviraux (189). L'activation du système immunitaire est liée à la progression de la maladie (190-193). Ainsi, les Tregs activés pourraient avoir un effet protecteur en contrôlant cette hyperactivation lors de l'infection chronique (194, 195). Cependant, l'excès d'activité des Treg, en parallèle avec la forte production d'IL-10 et des réponses immunes de type Th2, résulte en la suppression trop importante du système immunitaire. Cette inhibition conduit elle aussi, à la progression de la maladie (183, 196). Enfin, l'équipe de B. Kanwar et al. suggère que c'est l'équilibre relatif des deux sous-populations de cellules T : Th17 et Treg qui est la clef de la progression de la maladie vers la phase SIDA (197).

C. Les protéines du VIH impliquées dans la dérégulation du système immunitaire et l'échappement du VIH

C. 1 Les protéines accessoires du VIH impliquées dans l'échappement du virus

C. 1-a La protéine Nef

La protéine Nef est une phosphoprotéine de 27 kDa, retrouvée associée aux membranes cellulaires et incorporée aux virions lors du bourgeonnement. Le rôle le plus connu de Nef fut d'être la protéine accessoire du VIH empêchant la surinfection des cellules infectées suite à l'internalisation et la dégradation du CD4 de surface (198). Nef peut aussi diminuer l'expression de nombreuses autres molécules membranaires comme le CD8, les molécules de CMH de classe I : HLA-A et B et les molécules de co-stimulation CD80/CD86. Par cette action, elle inhibe l'activation des cellules immunitaires, la présentation antigénique et la mise en place de la réponse adaptative permettant l'élimination du virus par les CD8. En parallèle, Nef agit sur les PBMC et les monocytes/macrophages afin d'induire de nombreuses cytokines. En effet, elle peut induire l'expression de l'IL-10 de manière calcium/calmoduline dépendante et ainsi instaurer un affaiblissement du système immunitaire et favoriser l'échappement du virus (119). Le TNF- α , MIP1- α et MIP1- β , l'IL-1 β et l'IL-6 sont aussi des cytokines induites par Nef qui contribuent, dès la phase aigüe, à l'hyperactivation du système immunitaire nécessaire à la réplication/dissémination du virus (134, 136). Ces effets sont d'autant plus importants que Nef peut directement être cytotoxique pour les L_T et inhiber leurs proliférations et réguler l'apoptose des cellules infectées ou non (199). De nombreux travaux montrent la capacité de Nef à induire l'apoptose des CD4 suite à l'interaction avec le CXCR4 ou suite à l'expression de FasL sur les cellules. D'autres travaux, montrent que Nef inhibe l'apoptose des cellules infectées. Enfin, la protéine Nef peut aussi agir sur les L_B en les rendant moins répondeurs aux T CD4 et en inhibant le switch CD40 dépendant des IgG, IgA et IgE. Ceci, principalement par la capacité de Nef à induire I κ -B et les protéines SOCS qui bloquent le CD40L et la signalisation.

C. 1-b Les protéines Vpu et Vpx

Vpu est une phosphoprotéine de 16 kDa ancrée à la membrane par son domaine N-terminal. Contrairement aux autres protéines de régulation du VIH, Vpu est retrouvée uniquement dans le VIH-1. Dans le VIH-2 et chez le SIV, elle est remplacée par la protéine

Vpx. Vpu possède deux rôles majeurs: elle dégrade les molécules de CD4 et elle augmente la production de particules virales. En effet, Vpu interagit avec les complexes CD4-gp160 et les dirige vers le réticulum endoplasmique où ils sont dégradés. Plus précisément, après phosphorylation, Vpu peut fixer le CD4 dans le RE et conduit à sa dégradation protéasomique. Ainsi, Vpu prévient la formation du complexe CD4-gp160, libérant de ce fait la gp160 qui peut continuer son transport vers la surface cellulaire (133). Elle joue aussi un rôle dans la libération des particules virales. Notamment, Vpu peut former des canaux ioniques pouvant modifier le potentiel de la membrane cytoplasmique et faciliter la libération des virions (200). De plus, Vpu contribue à augmenter la virémie et le nombre d'infections *de novo* permettant ainsi l'échappement aux anticorps neutralisants et la progression de la maladie vers le stade SIDA (201).

Plus récemment, des travaux ont montré la capacité de Vpx à contrecarrer l'activité d'un facteur de restriction appelé SAMHD1 (202-205). SAMHD1 est une protéine comptant un domaine central HD possédant une activité nucléotidase et phosphodiesterase. Ces activités suggèrent que l'action antivirale de SAMHD1 serait médiée par sa capacité à réguler le métabolisme des dNTP. En effet, SAMHD1, présent uniquement dans les cellules myéloïdes, abaisse la concentration de dNTP intracellulaires dans les macrophages et les cellules dendritiques. Ces dernières ne pouvant plus supporter la transcription inverse du virus, elles deviennent alors non permissives à l'infection par le VIH. Vpx est une petite protéine nucléaire retrouvée incorporée aux virions suite à l'interaction avec la protéine p6 du précurseur Gag. Dans la cellule hôte, Vpx est associée avec l'ubiquitine ligase E3. Une fois la protéine Vpx exprimée dans la cellule ou introduite de manière exogène dans la cellule (*via* des « virus-like particles »), elle se lie à SAMHD1 et forme un complexe avec l'ubiquitine ligase E3. Cette dernière induit alors l'ubiquitination et la dégradation de SAMHD1. Ainsi, Vpx en inhibant/dégradant SAMHD1 lève la restriction et augmente la capacité du virus à infecter les cellules.

C. 1-c La protéine Vif

Vif est une protéine tardive de 23 kDa, essentielle à l'infectiosité des particules virales (206), l'assemblage et la maturation des virions. Elle joue aussi un rôle important dans l'échappement du VIH au système immunitaire inné (207). Notamment, en inhibant des cytidines déaminases appelées: APOBEC3G et APOBEC3F. APOBEC3G est induite par l'IFN. Elle est connue pour s'incorporer dans les virions et avoir une forte activité antivirale. En effet, APOBEC3G dans le virion induit une hypermutation G=>A dans l'ADN viral naissant,

le rendant ainsi, instable et incapable de s'intégrer au génome cellulaire (208). Lorsque Vif est présent dans le virion, il interagit avec APOBEC3G et 3F et conduit à leurs ubiquitylations et dégradations par le protéasome et par conséquent à l'échappement du virus (209).

C. 1-d La protéine Vpr

Vpr est une protéine de 14 kDa incorporée dans le virion. Vpr favorise la pénétration du complexe de pré-intégration viral dans le noyau des cellules non différenciées, par sa fixation sur l'importine- α (210). Elle bloque aussi le cycle cellulaire en phase G2, ce qui favorise la réplication virale (211). Ce blocage en G2 peut aussi être corrélé à l'interaction de Vpr avec la protéine p21 qui active le LTR et interagit avec Sp1, TFIID et CBP (212). Vpr agit aussi en induisant l'apoptose des cellules infectées ou non par des voies caspases dépendantes et indépendantes. De façon intéressante des mutations sur Vpr sont retrouvées chez les patients dits "non progresseurs" et suggèrent l'implication de la protéine Vpr dans l'évolution de la maladie vers le SIDA. Ceci fut également confirmé dans le modèle macaque Rhésus, où la délétion de Vpr réduit considérablement la pathogénicité du SIV.

C. 2 La protéine Tat : une protéine clef dans l'évolution de l'infection par le VIH

C. 2-a Quelques généralités sur la protéine Tat du VIH

- Domaines de la protéine Tat

Tat est une protéine conservée chez tous les isolats du VIH. Elle est produite très précocement au cours du cycle viral et joue un rôle primordial dans la réplication du virus et la pathogénèse associée à l'infection par le VIH. Cette protéine de 14 kDa est codée par deux exons, séparés par une région non codante. Le premier exon code pour les 72 premiers acides aminés de la protéine (figure 11). Notons que la protéine Tat du VIH-1 varie de 86 à 101 acides aminés alors que celle du VIH-2 fait 130 acides aminés. Mais la forme majoritaire retrouvée dans les isolats cliniques est une forme de 101 acides aminés. Une autre forme de 86 acides aminés est retrouvée chez les isolats du sous-type B et les souches de laboratoire HXB2. La protéine Tat est composée de 6 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal, une région riche en cystéines, un domaine core hydrophobe, une région basique, une région riche en glutamines et enfin un domaine C-terminal contenant un tripeptide RGD (arginine,

glycine, aspartate) (figure 11) (213). Un domaine nommé domaine de transduction de la protéine (PTD) est retrouvé dans la région basique de la protéine Tat. Ce PTD, riche en acides aminés basiques : lysines et arginines, confère à la protéine Tat la capacité de traverser les membranes et ainsi se retrouver aussi bien dans le milieu intracellulaire qu'extracellulaire.

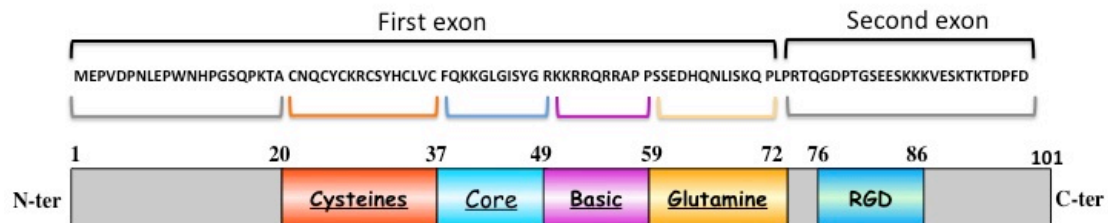


Figure 11. Organisation de la protéine Tat du VIH-1 : séquence primaire d'acides aminés et domaines de Tat. La protéine Tat est codée par 2 exons du génome du VIH et est composée de plusieurs régions. La région N-ter 1-21 est une région riche en proline. Une région impliquée dans la transactivation du VIH est la région 21-37 riche en cystéines. La région core 38-48 est impliquée dans la liaison de Tat à l'ARN. La région basique 49-59 dans l'internalisation de Tat tandis que la région riche en glutamine 60-72 dans la réplication du VIH. Enfin la dernière région comprenant la séquence RGD est codée par le second exon.

- Structure de la protéine Tat

Plusieurs études se sont penchées sur la structure de la protéine Tat (figure 12). Il apparait clairement que Tat fait partie de la famille des protéines non structurées (213, 214). Des études de dichroïsme circulaire ont permis d'analyser la structure secondaire de cette protéine. Ces travaux ont ainsi permis de montrer que Tat adopte majoritairement en milieu aqueux une conformation en feuillet beta et peu en hélice alpha. Cependant, dans un solvant organique 20 à 50 % de la protéine Tat adopte une conformation en hélice alpha. Des études par RMN menées par Bayer et al., Shojania S & al. et Watkins et al ont montré l'absence de structure organisée de la protéine Tat. Ils démontrent également que la région riche en cystéine et la région basique sont très flexibles (213). La région « core », elle, comprend un tryptophane hautement conservé chez tout les isolats (215). Toutes ces études suggèrent que Tat n'a pas de structure secondaire ni tertiaire organisées et qu'elle est nativement non structurée. En d'autres termes, cette forme native de la protéine peu structurée est suffisante pour son activité biologique. Cependant, il n'est pas à exclure que la protéine Tat adopte une conformation structurée suite à sa liaison avec ses cibles.

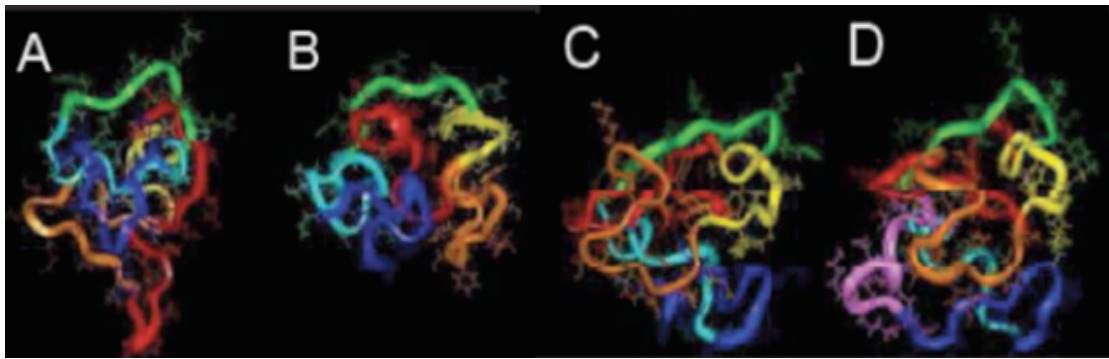


Figure 12. Structure tridimensionnelle de 3 variants de la protéine Tat. Les structures obtenues par RMN des variants de Tat Z2 (A), Tat Mal (C) et Tat Eli (D) sont représentés ci-dessus. Les six régions de Tat sont représentées en rouge, orange, jaune, vert, bleu clair et bleu. Les résidus en rose, sont présents à l'extrémité C-ter de la protéine Tat Eli. Le variant A a été chimiquement modifié, alors que les trois autres, biologiquement actifs, affichent un repliement similaire.

- Sécrétion/internalisation de la protéine Tat

Très précocement après l'infection par le VIH-1, la protéine Tat est produite et libérée dans le milieu extracellulaire. En effet, elle est retrouvée dans les tissus et le sang de patients infectés par le VIH-1. Xiao et al. ont trouvé des concentrations de l'ordre du nanomolaire de Tat circulante (0,1 à 4 nM) dans le sérum de patients infectés. Cette sécrétion se produit en absence de changements de perméabilité ou de mort cellulaire. Cette Tat extracellulaire peut alors agir sur des cellules infectées ou non, et contribue à la réactivation et à la pathogenèse du VIH. On retrouve chez 20-25% des patients infectés des anticorps anti-Tat. Cette production d'anticorps est d'autant plus importante qu'elle est corrélée négativement avec l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. En effet, les patients possédant des Ac anti-Tat progressent moins rapidement vers le stade SIDA (216). Malgré l'importance de la protéine Tat extracellulaire, peu d'études ont porté sur ses mécanismes de sécrétion ou d'entrée dans les cellules infectées ou non. Deux voies sont connues pour la sécrétion des protéines: les voies conventionnelles et non conventionnelles. La voie classique suit un parcours allant du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi et nécessite un peptide signal. La voie non-conventionnelle, elle, sécrète les protéines indépendamment du réticulum endoplasmique, du Golgi et du peptide signal. La protéine Tat ne possède pas de séquence signal à proprement dite. Elle semble être sécrétée par la voie non-conventionnelle. De nombreuses études ont décrit la capacité de Tat à recruter plusieurs protéines impliquées dans des activités cellulaires telles que l'endocytose, la phagocytose, l'exocytose ou encore l'adhérence cellulaire. Il semblerait que la région basique de Tat soit impliquée dans cette sécrétion. En effet, une mutation dans cette région

basique, augmente la localisation cytoplasmique et la libération de Tat. Toutefois, l'équipe de Rayne et al. a montré que la sécrétion de Tat n'est pas affectée par des inhibiteurs du cytosquelette et que dans les T CD4, Tat est sécrétée directement à travers la membrane plasmique. Plus précisément, Tat par la capacité de son domaine basique à lier spécifiquement le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) membranaire, s'accumule à la membrane plasmique. Cette interaction est stabilisée d'une part i) par l'insertion membranaire de la chaîne latérale du tryptophane de Tat et d'autre part ii) par la liaison de Tat avec une haute affinité avec le PIP₂ membranaire et les protéines recrutées (217). Dans la région riche en proline, le tryptophane en position 11 est essentiel pour la sécrétion de Tat par les cellules infectées (218, 219). Fait intéressant, ce résidu a été démontré comme essentiel à la translocation de Tat du milieu extracellulaire au cytosol des cellules (220). Des études ont montré que ce sont les résidus 48 à 60 du domaine basique, encore appelé PTD, qui sont nécessaire à cette internalisation (221). Tat interagit également avec les héparanes sulfates (HS) et les chaînes de protéoglycanes (HSPG) à la surface des cellules. Cette interaction active le recrutement de Rac1 aux radeaux lipidiques et permet l'internalisation du complexe Tat-HSPG par macropinocytose. Un second mécanisme d'internalisation de Tat, par les rafts et la cavéoline, a été décrit. Toutefois, il a été clairement démontré par l'équipe de Vendeville et al. que Tat entre dans les cellules par un phénomène d'endocytose clathrine, dynamine et Eps15 dépendante (191). Malgré tous ces mécanismes décrits pour Tat, aucun récepteur spécifique n'a été décrit pour favoriser son entrée dans les cellules. Ainsi, l'identification du récepteur potentiellement impliqué dans l'internalisation de Tat dans les cellules serait un atout majeur pour la compréhension des mécanismes d'entrée de Tat dans les cellules et la prévention de ses activités extracellulaires.

- Modifications post-traductionnelles de la protéine Tat

De par son activité sur la transcription du génome viral et ses diverses fonctions sur la modulation de l'expression des gènes cellulaires, Tat est soumise à diverses modifications post-traductionnelles. De nombreux travaux ont montré que Tat peut être phosphorylée, acétylée/désacétylée, ubiquitinée ou même méthylée sur des acides aminés spécifiques. Ces modifications post-traductionnelles permettent de modifier la structure, la stabilité et la localisation de la protéine Tat, mais aussi son interaction avec divers composés cellulaires. En effet, la protéine Tat du VIH est capable d'interagir avec les CDK (cyclines dépendante kinase) permettant ainsi sa phosphorylation. Les travaux de Herrman & Rice ont démontré la phosphorylation de la protéine Tat du VIH-2, mais pas du VIH-1, par la CDK9 (222). Plus

précisément, la CDK9 agirait sur les acides aminés : Thr85, Thr89 et Ser94 de Tat. La protéine Tat du VIH-1 quant à elle, peut aussi être phosphorylée par d'autres kinases telles que : la CDK2/cycline E et la PKR (protéine kinase R). En effet, plusieurs travaux ont montré la capacité de la CDK2/cycline E à phosphoryler Tat sur les acides aminés 15-24 et 36-49 (223-226). La PKR elle, semble phosphoryler Tat sur ses résidus Ser62, Tyr64, Ser68. Ces phosphorylations, semblent jouer un rôle dans la stabilisation de la liaison de Tat avec la région TAR de l'ARN viral naissant et la potentialisation de la transcription du génome viral (227, 228).

La protéine Tat peut aussi être acétylée et déacétylée. Tat a été décrite comme un substrat des HAT (histones acétyltransférases) telles que : p300/CBP, PCAF, Tip60 et la lysine 2A acétyltransférase (229, 230). Les deux HAT, p300/CBP et PCAF, jouent un rôle clef dans la transactivation et la répllication du VIH. En effet, p300/CBP acétyle Tat sur les Lys50 et 51 ce qui contribue au transfert de Tat au complexe d'élongation de la transcription comprenant la polymérase et l'HAT : PCAF. Cette HAT permet à son tour l'acétylation de Tat sur la Lys28 ce qui augmente sa stabilité de liaison avec la région TAR de l'ARN viral naissant. Tat peut être déacétylée sur sa Lys50, par SIRT1 (sirtuine désacétylase 1 de classe III).

La méthylation de la protéine Tat a également été décrite. En effet, Tat peut servir de substrat des PRMT (protein arginine methyltransferase) notamment la PRMT6. Cette interaction, Tat-PRMT6, induit la méthylation de Tat sur les résidus 49 à 63 riches en arginine et inhibe la transactivation du LTR par Tat. Une autre acétylation sur l'arginine 53 de Tat, diminue l'association Tat/PCAF et l'interaction Tat/TAR. Cette acétylation peut aussi améliorer la stabilité de Tat et inhiber sa dégradation protéasomique. La transactivation du LTR par Tat peut être inhibée après méthylation de Tat par d'autres méthyltransférases comme : SETDB1 (SET domain bifurcated 1) et KMT7 (lysine methyltransferase Set7/9). Ces travaux démontrent, l'importance de la méthylation des lysines et arginines de Tat dans la régulation de son activité transactivatrice.

Enfin, l'ubiquitination de Tat a aussi été décrite. Des études ont montré que HDM2, une ubiquitine ligase, interagit avec Tat et médie sa polyubiquitination sur la Lys71. Curieusement, cette ubiquitination stimule l'activité transcriptionnelle de Tat.

Pour résumer cette partie, de nombreuses études ont montré que la protéine Tat peut subir diverses modifications post-traductionnelles. Ces modifications semblent suffisantes et essentielles à la régulation des activités de Tat et à la transactivation du génome viral.

C. 2-b La protéine Tat : un rôle essentiel dans la transactivation du génome du VIH

La principale fonction de la protéine Tat et la plus connue, est de transactiver le LTR du génome viral. Une fois intégré, le génome du VIH se comporte comme le génome cellulaire. Il peut être transcrit puis traduit en protéines virales consécutivement à l'utilisation de l'ARN pol II et la machinerie cellulaire. Chez les eucaryotes, la transcription des gènes est strictement contrôlée au niveau de l'initiation et de l'élongation. Ainsi, le "switch" entre la transcription productive et la latence du VIH dépend de la balance entre les signaux positifs et les rétrocontrôles négatifs.

Transcription chez les eucaryotes (figure 13):

Quatre étapes clefs sont connues pour la transcription des gènes eucaryotes et sont illustrées dans la figure 13. La première étape consiste en la formation du complexe de pré-initiation (PIC) suite au recrutement de l'ARN pol II. La deuxième étape de clairance du promoteur, comprend la phosphorylation de la Ser5 de l'ARN pol II par la CDK7. Cette phosphorylation augmente la liaison et l'affinité de l'enzyme humaine de « capping » (HEC) à l'ARN et conduit à la mise en place d'une coiffe en 5' des ARN naissants. A cette étape, l'ARN pol II fait une pause suite au recrutement de deux facteurs négatifs d'élongation appelés: DSIF (facteur induisant la sensibilité DRB) et NELF (facteur négatif d'élongation). L'élongation productive nécessite le recrutement du complexe P-TEFb actif (facteur positif b d'élongation de la transcription) qui inhibe NELF et DSIF. P-TEFb se compose de la CDK9 et des cyclines de type-C ; CycT1, CycT2a, CycT2b ou CycK. L'activité de P-TEFb reste néanmoins strictement régulée. En effet, P-TEFb s'associe à un complexe composé d'un petit ARN nucléaire 7SK (RNA 7SK) et d'un hétérodimère HEXIM1/2. Cette interaction provoque un changement de conformation du complexe P-TEFb inhibant son activité kinase. Une fois activé, P-TEFb phosphoryle NELF et la Ser2 de l'ARN pol II, levant ainsi la pause. Le complexe P-TEFb est recruté sur l'ARN naissant par divers mécanismes, soit artificiellement soit par i) un co-activateur, ii) une molécule de liaison à l'ADN ou à la chromatine tels que NF-κB ou Brd4 respectivement ou iii) à l'ARN comme la protéine Tat du VIH. Cette dernière est indispensable à l'initiation de la transcription du génome viral.

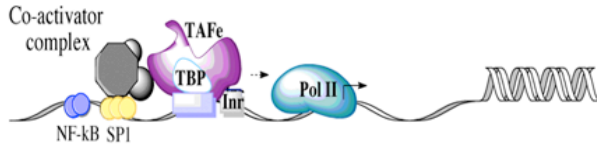
Transcription du génome du VIH (figure 13) :

Le LTR du VIH comprend une région proximale suivie d'un promoteur distal. On retrouve dans la région proximale une séquence d'initiation (Inr) et une TATA box. Le

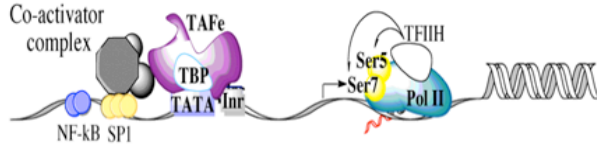
promoteur distal nécessite des séquences dites “enhancers” qui recrutent l’ARN pol II au site d’initiation de la transcription. Il s’agit de 2 sites NF- κ B et 3 sites SP1 (231, 232). Le LTR présente un ARN naissant avec une structure tiges-boucles appelée TAR (Transcription associated Region) (48, 233). Les quatre premiers domaines de Tat sont indispensables à la transactivation et à l’expression du génome viral. La protéine Tat du VIH lie cette structure TAR et recrute le complexe ARN 7SK/P-TEFb à l’ARN pol II. Cette interaction est médiée par les domaines riches en arginine de Tat. L’association de Tat à la cycline T1 se fait par le domaine basique. Ces interactions mènent alors à l’élongation efficace de la transcription. La protéine Tat peut aussi lier d’autres cofacteurs impliqués dans la transcription tels que : Sp1, TBP (TATA box binding protein), CDK22, CBP/p300 et TFIIH et activer l’élongation efficace de la transcription. Ainsi, en absence de Tat, la transcription est initiée mais l’élongation est inhibée et conduit à une transcription abortive. La transcription du LTR du VIH-1 est environ une centaine de fois plus efficace en présence de Tat.

Dès lors, comment le VIH permet la production suffisante de Tat en absence d’élongation ? Lors de l’entrée du virus, le TLR8 reconnaît et lie l’ARN du VIH-1. Cette interaction induit l’activation de NF- κ B et la phosphorylation de la Ser5 de l’ARN pol II ce qui conduit au recrutement de l’ARNpol II avec la CDK7 au complexe de transcription. De façon intéressante, il a été montré que l’élongation dépend aussi de l’interaction gp120/DC-SIGN (234). Cette interaction active l’élongation consécutivement à la phosphorylation de la Ser276 de p65 et de la Ser5 de l’ARN pol II. Une fois phosphorylées, ces molécules sont recrutées avec la CDK9 au LTR. Ces mécanismes peuvent alors expliquer comment le VIH produit un taux suffisant de protéine Tat. Une fois le taux de Tat faible, la transcription s’arrête et fait place à la latence. Ces mécanismes expliquent l’importance de Tat dans la régulation du cycle viral et la balance entre : transcription productive et latence.

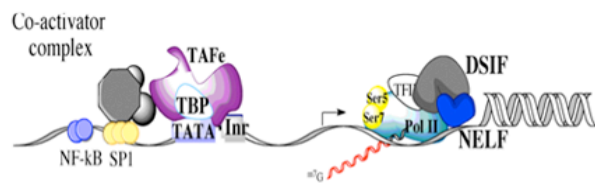
Formation du complexe de pré-initiation



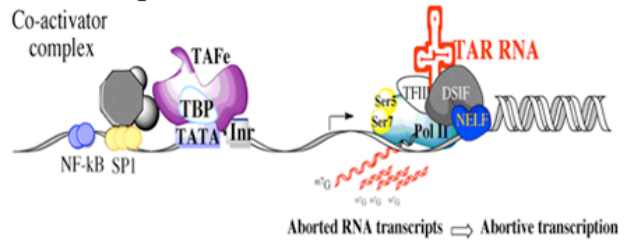
Clairance du promoteur



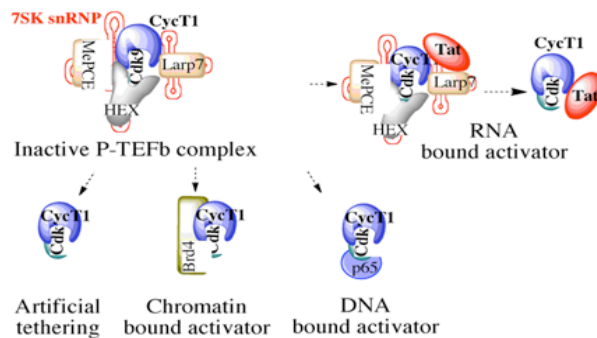
Coiffe 5' et pause



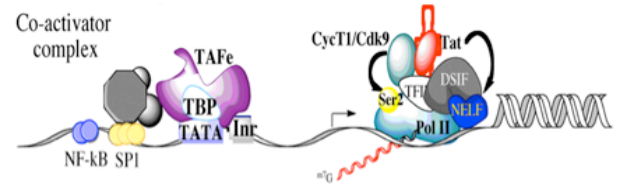
Transcription abortive



Recrutement de P-TEFb



Elongation efficace



Elongation initiale

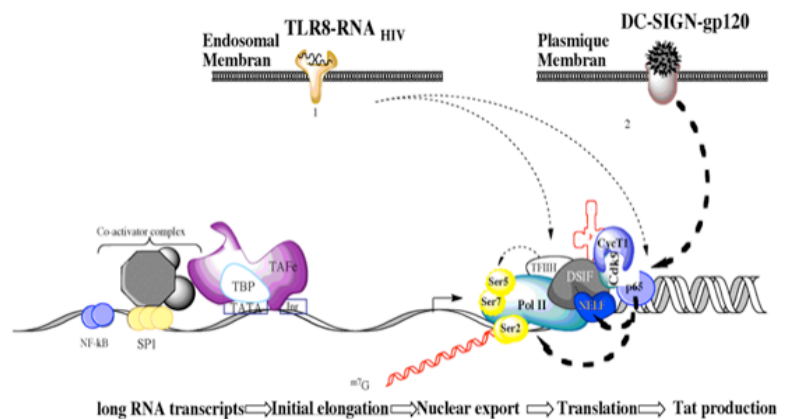


Figure 13. Transcription du génome du VIH: implication de la protéine Tat. La première étape consiste en la formation du complexe de pré-initiation et le recrutement de l'ARN pol II sur le promoteur. L'étape suivante consiste en la phosphorylation de la sérine 5 du CTD de l'ARN pol II par la CDK7 de la protéine TFIID. Une pause de l'ARN pol II se fait par le recrutement des facteurs négatifs d'élongation: DSIF et NELF. Enfin, l'élongation se fait par le recrutement de P-TEFb. P-TEFb est strictement régulé par son association avec un complexe composé par l'ARNsn 7SK et un hétérodimère HEXIM1/2. Le recrutement de P-TEFb par Tat conduit à l'élongation efficace et à l'obtention des transcrits d'ARN.

C. 2-c Tat, une protéine d'échappement du VIH : rôle dans la pathogénèse

En plus de son rôle dans la transactivation, Tat est sécrétée par les cellules infectées. Cette Tat extracellulaire, peut alors se lier aux héparanes sulfates et aux protéoglycanes *via* ses résidus basiques (235). Par ces liaisons, Tat est protégée de la dégradation et peut agir sur les cellules voisines infectées ou non. Tat est également impliquée dans la modulation de l'expression de divers gènes cellulaires. C'est ainsi que Tat favorise la réplication, la dissémination du VIH, l'affaiblissement du système immunitaire, l'évolution de la maladie vers la phase SIDA et la pathogénèse de l'infection par le VIH.

- Rôles dans l'évasion, la propagation et la dissémination du VIH

** Rôles dans la dissémination du VIH*

La protéine Tat, produite très précocement au cours du cycle viral, est capable de moduler l'expression des récepteurs et corécepteurs du VIH. Plusieurs études ont montré la capacité de Tat à augmenter l'expression des CCR3, CCR5 et CXCR4 sur les monocytes et les T CD4 ce qui favorise l'infection par les souches R5 et X4. De plus, Tat permet le recrutement et l'activation des cellules cibles du VIH en induisant la synthèse de chemoattractants par les DC (138), et la production d'IL-8 et d'IL-2 par les L_T (236). Enfin, Tat possède une activité «chimokine like» (237) qui lui permet de recruter et d'activer les macrophages, DC, lymphocytes et les cellules endothéliales. En effet, la liaison de Tat aux VEGFR-1 (récepteur aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire) sur les monocytes et les cellules endothéliales ce qui permet leurs recrutements (238, 239). En outre, Tat augmente l'expression de l'intégrine-β2 sur les monocytes favorisant de ce fait leurs adhérences sur l'endothélium vasculaire (240). Tat est aussi capable de se lier et/ou déplacer la liaison des β-chimiokines à leurs récepteurs CXCR4, CCR2 et CCR3 mais pas aux CCR1, CCR4 et CCR5 présents sur les monocytes et les PBMC. Ces interactions impliquent la région riche en cystéine de Tat. Plus précisément, les résidus 24 à 51 et la cystéine 31 sont impliqués dans l'interaction Tat-CCR2 ou CCR3. Le tripeptide RGD et le domaine basique sont eux, impliqués dans la migration des DC (241, 242). Plusieurs études ont rapporté que la protéine Tat est aussi impliquée dans la migration des L_B et des leucocytes polynucléaires. Ainsi, en mimant les β-chimiokines, Tat induit le chimiotactisme des cellules et conduit à la migration et aux recrutements des cellules non infectées vers les cellules infectées (237, 243, 244).

** Rôles dans l' Infection des cellules par le VIH*

En plus de ses propriétés chimiotactiques, Tat peut activer les cellules et provoquer une infection productive. Des études ont rapportés que l'interaction de la cystéine 31 de Tat avec le CCR2 ou CCR3, induit une mobilisation du calcium intracellulaire responsable de l'activation des macrophages. Tat possède des activités biologiques variées. Elle mime notamment l'effet du TNF- α . En effet, en activant les MAP kinases et les facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1, Tat favorise la réplication du VIH. En outre, Tat régule positivement l'expression du récepteur à l'IL-2, CD25, dans les cellules infectées par le VIH. Ainsi, Tat contribue à favoriser l'activation des cellules infectées et la réplication virale (245, 246). En accord avec ces observations, des études ont montré que Tat peut rendre les cellules permissives et induire une infection productive. Elle active de manière antigène dépendante les cellules T non infectées, provoquant par la suite, l'activation des MAP kinases et la progression du cycle cellulaire en phase G1. Aussi, l'activation des monocytes par Tat peut être médiée indirectement par l'expression de cytokines comme l'IL-1 β et le TNF- α . La protéine Tat extracellulaire peut, à une concentration de l'ordre du picomolaire, induire la survie et la croissance des lignées T. Cette propriété est due à la capacité de Tat à moduler l'expression des gènes de survie tels que p53, Bcl2, et CD95 ligand (247-250).

** Rôles dans la progression de la maladie*

Tat peut aussi jouer un rôle actif dans la progression de la maladie par sa capacité à lier et activer les intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_3$ et VEGFR-2 (235, 251). Aussi, Tat interagit avec les protéoglycanes et les héparanes sulfates sur les lymphocytes, augmentant leurs adhérences et migrations à travers l'endothélium. Par son tripeptide RGD et son domaine basique, Tat, partage les récepteurs aux MCP-1, MCP-3 et à l'éotaxine. Ces molécules sont connues pour réguler l'intégrité de la matrice extracellulaire suite à la production de métalloprotéinases (MMP). Récemment dans les astrocytes, il a été montré que Tat induit l'expression de la MMP9 *via* NF- κ B. La conséquence de la production de MMP9 par Tat est la destruction de la barrière hémato-encéphalique. Cette destruction contribue à la dissémination du VIH dans le système nerveux central et la progression de la maladie.

Tableau 2 : Récapitulatif des effets de la protéine Tat sur la pathogénicité du VIH.

Effets de Tat	Mécanismes	Cibles	Conséquences
Dissémination	Augmentation de l'expression des récepteurs/co-récepteurs du VIH	monocytes, T CD4	Augmentation de l'infection
	Activité «chimiokine like»	monocytes, DC	Augmentation de la migration cellulaire
Infection productive	Interaction avec les récepteurs CCR et CxCR	macrophages, DC, LT et LB	Activation des cellules
	Production d'IL1- β et de TNF- α		Augmentation de la division cellulaire
	Augmentation de l'expression de CD25		
	Modulation des gènes de survie		Survie cellulaire
Progression de la maladie	Activation des récepteurs aux intégrines	cellules vasculaires	Angiogénèse et dissémination du VIH
	Expression des MPP (métalloprotéinases)	astrocytes	Destruction de la barrière hémato-encéphalique

- Effets de la protéine Tat du VIH sur le SNC

Le stade SIDA est souvent associé à des complications neurologiques importantes. On estime qu'approximativement 1/3 des adultes infectés développent une démence, une encéphalite et/ou un dysfonctionnement neurologique. Ces troubles sont caractérisés par un infiltrat de macrophages, la présence de cellules géantes et des lésions neuronales abondantes. On retrouve aussi un stress oxydatif et l'apoptose des cellules, une forte production de cytokines inflammatoires, de chimiokines, de lipides et d'acides aminés tels que le glutamate. De nombreux travaux ont ainsi montré que ces divers effets sont la conséquence de l'action de plusieurs protéines du VIH dont la protéine Tat. En effet, en plus de la protéine Tat sérique, plusieurs études ont révélé la présence de Tat et de son ARNm dans le cerveau de patients ou de macaques Rhésus infectés et atteints d'encéphalites et

démences (252-254). Par ailleurs, Tat est essentielle et suffisante pour induire des neuropathologies associées au VIH. Des souris transgéniques exprimant Tat sous contrôle du promoteur GFAP, développent spontanément des neuropathologies semblables à celles observées chez les patients infectés développant le neuroSIDA (255, 256). La neurotoxicité induite par Tat peut être due à des effets directs ou indirects sur les cellules neuronales.

** Effets directs de Tat sur le SNC*

Plusieurs travaux ont démontré la capacité des protéines du VIH telles que Tat, Nef et la gp120 à provoquer l'apoptose des cellules (257) (figure 14). Au niveau du SNC, la neurotoxicité induite par Tat implique son interaction avec la membrane des cellules neuronales (257-259). Tat sécrétée par les cellules infectées, interagit avec les membranes synaptosomales et le récepteur LRP des neurones (260, 261). Suite à cette interaction, Tat est internalisée dans les cellules et induit leur apoptose responsable de la neurotoxicité observée chez les patients. *In vitro*, il a été démontré que la voie des MAP kinases est indispensable à la neurotoxicité induite par Tat. En effet, l'apoptose induite par la protéine Tat intracellulaire est due à l'activation des caspases 3, du cytochrome c mais aussi à la libération de l'endonucléase G des mitochondries (figure 14). L'internalisation de Tat par le LRP, peut permettre à Tat d'être localisée dans le noyau où elle peut moduler l'expression des gènes pro et/ou anti-apoptotiques. En effet, Tat augmente l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que *bax* et diminue l'expression de gènes anti-apoptotiques comme *bcl2*. Tat interagit et augmente aussi l'expression de p73 dans les astrocytes (252). Elle interagit aussi, directement avec la tubuline polymérisée ou le dimère de tubuline $\alpha\beta$ non polymérisée. En outre, Tat interagit avec une seconde protéine impliquée dans la polymérisation des microtubules: LIS1 (262). Ces interactions modifient la dynamique de formation des microtubules. Notamment en inhibant la dépolymérisation ou en facilitant la polymérisation des microtubules Tat à pour conséquence d'activer l'apoptose (263).

Un autre mécanisme impliqué dans la neurotoxicité associée au VIH est la mobilisation du calcium par Tat. En effet, la mobilisation du calcium intracellulaire est connue pour conduire à la production de ROS, l'activation des caspases et ainsi induire l'apoptose. Il a été montré que l'interaction Tat-LRP forme un complexe avec les récepteurs au NMDA au moyen d'une protéine scaffolding : PSD95, et induit un influx calcique. Cet influx conduit à la production, PYK2 dépendante, de la nNOS et par conséquent à la mort neuronale. Tout comme dans les neurones, Tat peut induire la production et l'activation de la NOS dans les astrocytes. En outre, des études ont montré que Tat, sous forme de dimère

associé par des ponts de zinc entre les régions riches en cystéine, peut interagir directement avec les récepteurs au NMDA et induire son activation. Cette interaction facilite le flux calcique suite à la fixation du glutamate ou du NMDA sur les cellules. Dans les neurones, Tat active également la PI3K qui augmente la production d'IP3. La liaison d'IP3 sur ses récepteurs au niveau du RE, libère le calcium intracellulaire et conduit à l'inhibition du complexe IV de la chaîne des électrons, l'activation des caspases et des PKC- α , PKC- ϵ , PKC- ζ impliquées dans le stress oxydatif.

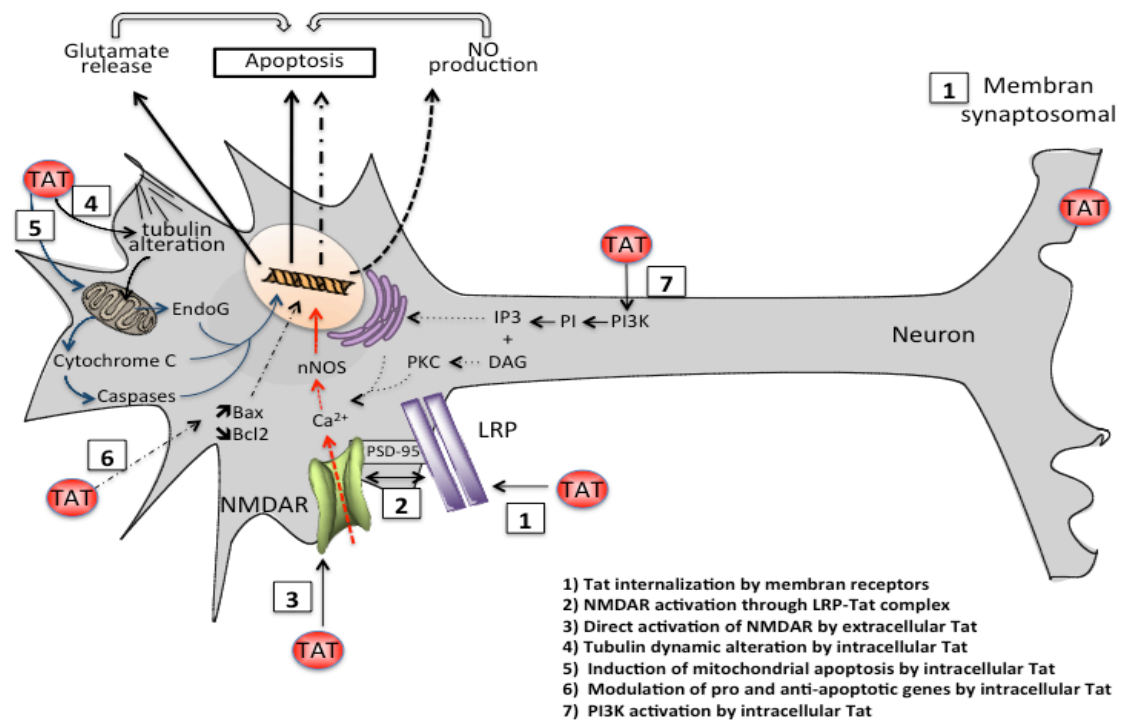


Figure 14. Représentation des divers effets directs de Tat sur le SNC. 1) Internalisation de la protéine Tat par les récepteurs membranaires. La protéine Tat intracellulaire peut alors activer diverses signalisation et molécules intracellulaires pour induire l'apoptose des cellules; 2) Activation du récepteur au NMDA suite à la formation du complexe LRP-Tat; 3) Activation directe du NMDAR par la protéine Tat; 4) Altération de la tubuline par la protéine Tat intracellulaire; 5) Induction de l'apoptose mitochondriale par la protéine Tat intracellulaire; 6) Modulation des gènes pro et anti-apoptotiques par la protéine Tat intracellulaire; 7) Activation de la PI3K par la protéine Tat.

* Effets indirects de Tat sur le SNC

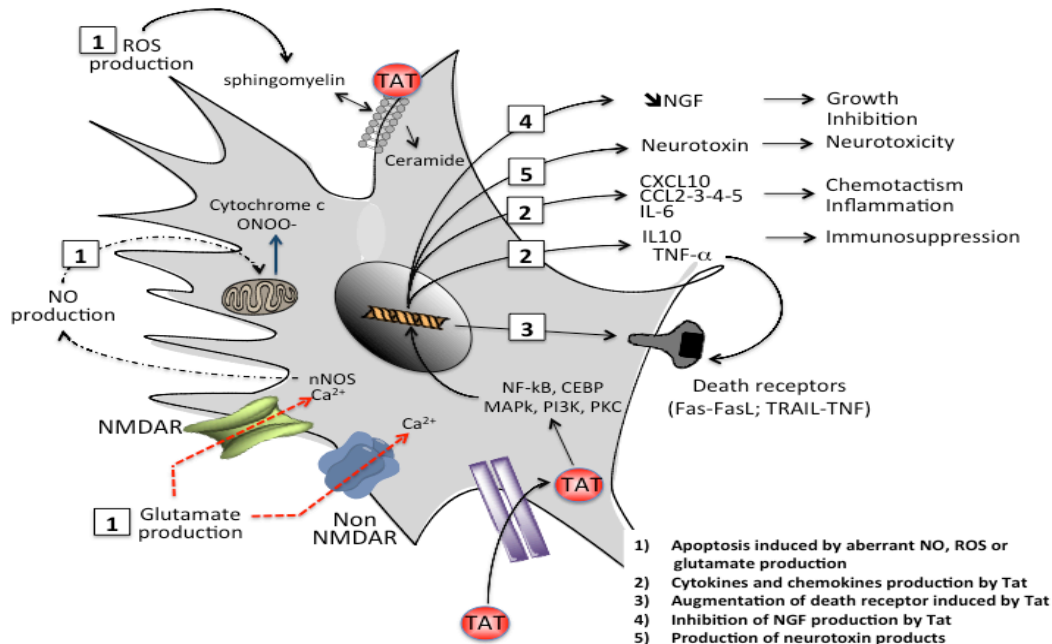
La protéine Tat du VIH peut aussi induire une neurotoxicité par des mécanismes indirects (figure 15). Ces mécanismes impliquent la production de NO, le stress oxydatif, la production de cytokines, chimiokines et de neurotoxines. Le stress oxydatif est un mécanisme biologique qui induit l'oxydation des protéines, de l'ADN, la peroxydation des lipides. Tout cela contribue ainsi à la mort cellulaire. Le stress oxydatif est causé par l'accumulation de diverses molécules altérées par les ROS. Les ROS sont des molécules

hautement réactives telles que les radicaux hydroxylés, les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène. Tat peut induire un stress oxydatif conduisant à la neurotoxicité et à la démence. Ceci suite à l'activation de la NO synthase (NOS) et de la production de NO après interaction avec les récepteurs NMDA. En effet, après production de NO par les astrocytes et les neurones, les cellules voisines entrent en apoptose. Ce processus est médié par l'interaction des NO avec le cytochrome c mitochondrial, entraînant par la suite la libération du calcium mitochondrial et la production de ONOO⁻. Ces 2 molécules sont impliquées dans l'établissement des dommages membranaires et de l'ADN mitochondrial causant l'apoptose.

En fait, Tat induit dans les cellules gliales et les macrophages la production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-10 de manière PKC, MAP kinases et NF- κ B dépendante. Ces cytokines engendrent des processus dégénératifs et l'apoptose. Bien que l'IL-10 soit associée à la progression de la maladie vers le SIDA, l'IL-6, l'IL-8, le TNF ou le CXCL8 induisent la neurotoxicité et la démence associée au VIH. Tat peut aussi induire la mort cellulaire par l'activation de la caspase 3 et 8. Ces caspases sont activées consécutivement à la production de TNF- α et à sa liaison au récepteur TRAIL. Il a également été montré que Tat augmente l'expression de TRAIL, de Fas/Fas ligand dans les astrocytes ce qui conduit à l'apoptose des cellules. Le TNF- α induit par Tat, augmente aussi la production de NO par des cellules infectées. Ceci contribue à la production de glutamate par les astrocytes et à la production de neurotoxines telles que l'acide quinolinique par les cellules microgliales. L'accumulation de NO et de glutamate près des neurones conduit à l'activation du récepteur au glutamate et au NMDA. Ces derniers mènent à l'influx calcique et provoquent la neurotoxicité et la démence chez les personnes infectées.

Tat peut aussi induire l'expression de CCL2, CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5 par les monocytes, les lymphocytes T et les cellules de la microglie. Ces chimiokines recrutent et stimulent la migration des cellules. En plus Tat inhibe l'expression du NGF, induisant par la même l'inhibition de la croissance, la nécrose des tissus, et la neurotoxicité associée à la démence.

Récemment, il a été montré que Tat induit l'expression de plusieurs facteurs neurotoxiques impliqués dans l'affaiblissement du système immunitaire et le développement du neuroSIDA. En fait, Nair MP et al. ont démontré que Tat induit dans les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules microgliales l'expression de la kynurénine (KYN) et la réduction de la sérotonine (5-HTT) et de son transporteur (264, 265). Ces facteurs sont impliqués dans le déficit en tryptophane associé à une altération des neurones dans le SIDA.



C. 2-d Le rôle de Tat dans la dérégulation du réseau de cytokines

Nous avons montré jusqu'ici la capacité de la protéine Tat à participer à l'infection et la pathogénicité du VIH. Ces effets passent, pour la plupart du temps, par la capacité de Tat à induire la production diverses chimiokines et cytokines. En effet, la protéine Tat extracellulaire peut induire la production de divers cytokines comme le TGF- β , l'IL-2, l'IL-10, l'IL-6, l'IL1- β , l'IL-8 et le TNF- α par de nombreuses cellules dont les monocytes/macrophages (118, 233, 266-271). Cependant, la surexpression de Tat réduit l'expression des ARNm de l'IL-2 et de son récepteur, IL-2R, et inhibe la production d'IL-12 par les PBMC (272). Fait intéressant, il a été montré que selon le sous-type de VIH, Tat module différemment l'expression des cytokines et chimiokines dans les monocytes primaires. En effet, la Tat de clade B augmente la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α alors que celle du clade C augmente la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10. De nombreuses études ont démontré la capacité de Tat à induire la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , CCL2, l'IL-6 à partir de monocytes/macrophages et DC [22]. D'autres travaux montrent que Tat peut aussi agir sur

les macrophages et astrocytes du système nerveux central afin d'induire l'IL-1 β et le TNF- α (273). Tat peut aussi induire la production d'IL-8 et d'IL-2 par les L_T (236). Ces cytokines, produites par la protéine Tat, contribue à l'hyperactivation du système immunitaire observée au cours de la phase aigüe de l'infection par le VIH. En parallèle, la forte induction d'IL-10 par Tat est essentielle à la progression rapide de l'infection vers la phase SIDA. En effet, l'IL-10 a une forte action inhibitrice sur les lymphocytes T. De plus, sa production accrue par Tat pourrait supprimer les fonctions des lymphocytes T. Tat induit la production d'IL-10 dans les monocytes par un mécanisme dépendant du calcium (267, 274, 275). Les travaux du laboratoire ont aussi montré l'implication d'une voie indépendante du calcium, notamment *via* l'activation des PKC, des MAP kinases et de NF- κ B et AP-1. Ainsi Tat, agissant sur les cellules du système immunitaire, représente une protéine clef de la dérégulation du réseau de cytokines responsable de l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. Malgré la pléiotropies de récepteurs décrits pour Tat, peu d'études ont été consacrées à la compréhension des signaux transduits suite à l'interaction de Tat avec ses récepteurs pour la synthèse de cytokines.

D. Problématique du laboratoire

L'hyperactivation et l'affaiblissement du système immunitaire jouent un rôle majeur dans l'infection au VIH et l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. Cette hyperactivation est entre autre due à la dérégulation du réseau de cytokines. Plus particulièrement la production d'IL-10 et de TNF- α , est une étape clef dans l'évolution de l'infection, la pathogénèse associée à l'infection par le VIH et la déplétion des lymphocytes. Cette déplétion lymphocytaire contribue à la destruction de la barrière gastro-intestinale et à la translocation dans la circulation de produits microbiens. A leur tour, ces pathogènes participent à la dérégulation du réseau de cytokines et à l'hyperactivation du système immunitaire qui mènent plus tardivement à l'affaiblissement de ce dernier. L'hyperactivation et l'affaiblissement du système immunitaire étant observés bien avant le stade terminal SIDA (75), ils feraient intervenir des facteurs cellulaires mais aussi viraux. L'un des candidats viraux participant activement à cette dérégulation, décrit dans le chapitre précédent, est la protéine Tat du VIH-1.

En effet, nos travaux au laboratoire ont permis de montrer que Tat agit à la membrane des monocytes pour induire la production d'IL-10 et de TNF- α par les monocytes

humains. D'autre part, nous avons mis en évidence en détails les voies de signalisation requises pour la synthèse de ces 2 cytokines. Tat interagit à la surface des monocytes avec un/des récepteurs pour activer les voies PKC, MAP kinases ERK1/2 et p38 et NF- κ B responsables de la production d'IL-10. La production de TNF- α , quant à elle, dépend des voies calciques. Mon projet de thèse est dans la continuité des travaux développés au laboratoire. Il a pour but de définir les voies de transduction activées par la protéine virale Tat dans le monocyte. Notamment, nous avons tenté d'élucider les mécanismes par lesquels Tat induit la dérégulation du réseau de cytokines par les monocytes humains. Sachant l'importance du TNF- α de l'IL-10 dans l'hyperactivation et l'immunosuppression du système immunitaire, il nous est apparu essentiel de déterminer comment Tat induit la production de ces cytokines par les monocytes humains. Ceci afin de mieux comprendre le rôle de Tat dans la physiopathologie et l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. Ainsi, l'une des questions essentielles qui reste posée est la nature du récepteur membranaire activé par Tat, capable d'induire les signalisations, décrites au laboratoire, responsables de la production d'IL-10 et de TNF- α .

En tenant compte de nos résultats, un grand nombre d'arguments permet de suggérer le TLR4 (Toll Like Receptor 4) comme récepteur candidat pour la protéine Tat du VIH-1 :

- Tat agit au niveau membranaire et le TLR4 et ses cofacteurs CD14 et MD2 sont exprimés à la surface des monocytes.

- Les voies de signalisation activées par le TLR4 incluent les MAP kinases ERK1/2, p38 et les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Notons que nous avons montré, que ces mêmes voies sont aussi activées par Tat pour la synthèse de cytokines (118, 268, 274-276).

- La signalisation induite par Tat dans le monocyte active les PKC- α , PKC- β II, PKC- δ et PKC- ϵ (118, 274-276). De façon intéressante des études récentes ont rapporté l'implication des PKC- ϵ (277), PKC- ζ (278, 279), et PKC- δ (280) dans les voies de transduction activées par le TLR4. Il semble donc qu'il existe un lien entre les voies PKC activées par Tat et celles des TLR.

- En plus, plusieurs virus tels que le MMTV (*via* la protéine Env) (281), le RSV (*via* la protéine F) (282), le virus VSV (*via* la protéine G) (283) et les coxsackie virus sont capables de stimuler la production de cytokines dont l'IL-10 et le TNF- α par le TLR4.

- Enfin, de façon très intéressante, la séquence de la protéine d'enveloppe du MMTV, reconnue par le TLR4 des monocytes, est similaire aux 20 premiers acides aminés de la

protéine Tat. Ceci suggère que ces 20 premiers acides aminés peuvent être un PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern), ligand du TLR4.

Ainsi, l'objectif de mon projet de thèse est donc centré sur le rôle du TLR4 comme récepteur potentiel de la protéine Tat, capable de transduire ses signaux, pour la production d'IL-10 et de TNF- α par les monocytes humain. Le chapitre suivant sera consacré à la compréhension des mécanismes d'activation et de régulations des TLR mais aussi leurs implications dans l'infection par le VIH.

*Chapitre II.
Les Toll Like Receptors : rôle bénéfique
pour le système immunitaire ou le virus ?*

A. Avant-propos

Chez l'homme, des mécanismes de reconnaissance des pathogènes et des molécules du non soi permettent d'éliminer les éléments étrangers. En 1989, le modèle du soi et du non soi proposé par Janeway permet d'expliquer les réponses immunes contre les antigènes extérieurs. C'est Polly Matzinger qui introduit la notion de signaux de dangers (284) qui vont stimuler l'immunité. Notamment, les signaux de dangers relargués par les cellules endommagées lors d'infections bactériennes, virales, fongiques mais aussi lors de processus non infectieux comme les tumeurs ou les nécroses. Il s'agit de molécules normalement séquestrées dans les cellules telles que l'acide urique, les HSP (Heat-Shock Protein), les acides nucléiques. Ces signaux endogènes sont appelés DAMP (Danger-Associated Molecular Patterns) et complètent la liste des signaux exogènes appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces derniers sont reconnus par des récepteurs appelés PRR (Pathogen Recognition Receptor), présents au niveau extracellulaire ou intracellulaire en fonction des ligands reconnus. Ainsi, on détermine 3 classes de PRR : i) les PRR d'endocytose tels : les "scavengers receptors" et les lectines de types C ; ii) les PRR de signalisation qui regroupent les TLRs, les NLRs et les RLHs et iii) les PRR solubles comprenant les collectines, les ficolines et les pentraxines. Ces PRR ont pour buts de reconnaître les PAMP ou DAMP, d'activer les cellules et mettre en place l'immunité innée et adaptative. La réponse innée consiste à produire des cytokines dont l'IFN- α/β , à activer les systèmes de restrictions et à activer les cellules qui vont présenter les Ag aux L_T et orienter les réponses immunes par la sécrétion de cytokines. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur une famille de PRR particulier : les Toll Like Receptors.

B. Les sentinelles de l'immunité innée : les TLR

B. 1 Généralités sur les TLR

B. 1-a Origine des TLR

A la fin des années 1990, le premier récepteur Toll fût découvert chez *Drosophila melanogaster*. Ce gène fut initialement impliqué dans l'embryogénèse et la mise en place de l'axe dorso-ventral. En 1996, Jules Hoffman et son équipe montre l'implication de Toll dans l'immunité antifongique chez la drosophile (285). A l'heure de cette découverte, les TLR étaient connus chez les mammifères. En effet, en 1996 l'équipe de Taguchi identifie le chromosome de TIL actuellement nommé TLR1 (286). Beaucoup de travaux se sont penchés

sur le rôle du TLR1 dans le développement embryonnaire des mammifères. Ce n'est qu'en faisant le rapprochement entre l'homologie de séquence du domaine cytoplasmique de Toll avec un récepteur de l'immunité des mammifères, IL1-R, que des travaux se sont penchés sur le rôle des TLR dans l'immunité. En 1997, Charles Janeway, Ruslan Medzhilov et leurs collaborateurs identifient un paralogue de TIL nommé hToll, actuellement appelé TLR4 (287). En reprenant les travaux de J. Hoffmann, ils suggèrent l'implication du TLR4 dans l'activation de l'immunité adaptative. Cette hypothèse fut confirmée en 1998 par l'équipe de Bruce Beutler qui a étudié les conséquences de la perte d'expression du TLR4 chez la souris après injection de LPS bactérien (288). Cette étude conclue à la spécificité de reconnaissance du LPS par le TLR4 et suggère que chaque TLR pourrait reconnaître une molécule particulière témoignant d'une infection en cours. Depuis, 10 TLRs ont été identifiés chez l'Homme (289). Les TLR représentent des récepteurs clefs permettant de détecter une infection et de déclencher la réponse immune.

B. 1-b Structure des TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par un domaine extracellulaire riche en leucines (LRR) et un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL1 Receptor) (figure 16). L'ectodomaine des TLR, en forme de fer à cheval, comprend 19 à 25 tandems de motifs LRR composés chacun de 24 à 29 acides aminés incluant une séquence consensus XLXXLXX et espacés de 20-30 résidus d'acides aminés hydrophobes conservés (290) (figure 16). Chaque LRR comprend un feuillet β relié à une hélice α . C'est la partie LRR qui diverge entre les TLR et qui confère la spécificité des PAMP reconnus. La partie cytoplasmique TIR, homologue à celle du récepteur à l'IL1, est quant à elle impliquée dans la signalisation.

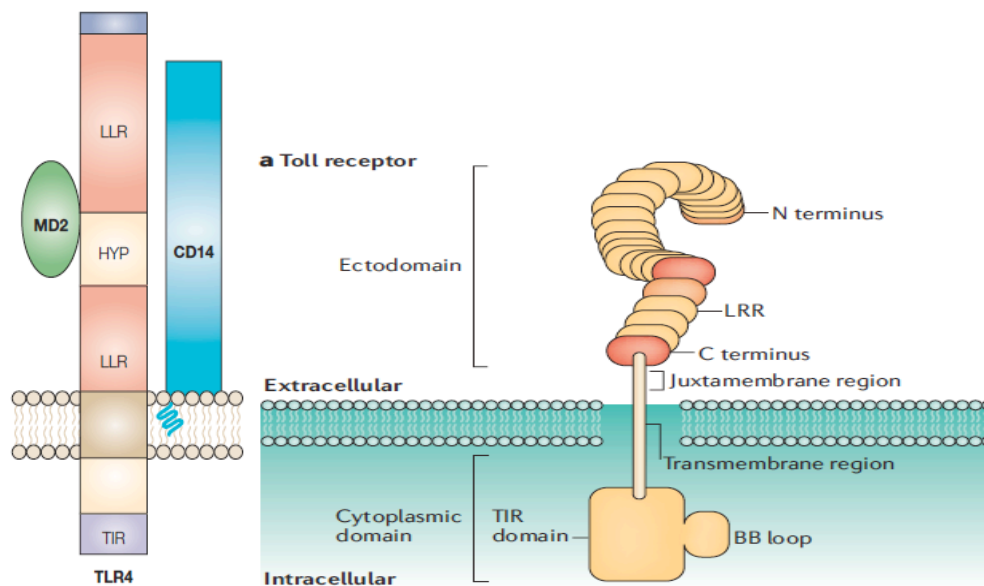


Figure 16 : Représentation de l'architecture d'un TLR [modifié de (291)]. Les TLR sont constitués d'un ectodomaine extracellulaire comprenant les Leucines Rich Repeats (LRR), une région transmembranaire et un domaine intracellulaire.

B. 1-c Activation des TLR

Les TLR sont présents sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères (292). La reconnaissance du PAMP et sa liaison aux TLR est essentielle mais pas suffisante pour l'activation de ces derniers. En effet, la conformation des domaines intra-cytoplasmiques des TLR ne permet pas l'accessibilité des domaines TIR aux adaptateurs des voies de signalisation. L'activation des TLR nécessite un changement de conformations nécessaire à leurs activations (293) (figure 17).

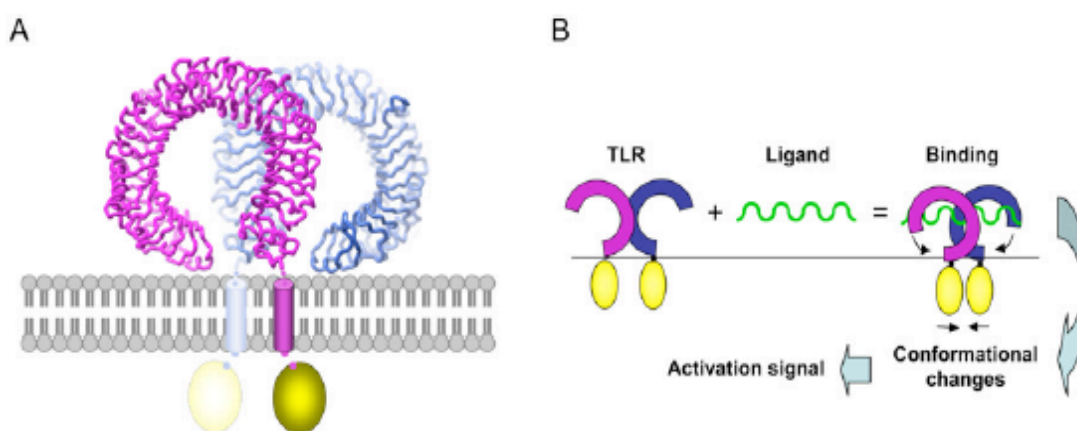


Figure 17 : Schéma d'activation d'un TLR (290). Après fixation du ligand, les TLR se dimèrisent *via* les régions C-terminales extracellulaires. Les TLR forment une structure en « fer à cheval ». Les LRR fixent le ligand ce qui induit un changement de conformation permettant le rapprochement des domaines intracellulaires TIR et l'activation des voies de signalisations.

C'est notamment suite à la reconnaissance du ligand que les TLR et plus particulièrement l'ectodomaine, subit un changement de conformation. Ce changement conformationnel permet le rapprochement des domaines intra- cytoplasmiques rendant ainsi accessible les domaines TIR. Les domaines TIR accessibles, ils peuvent alors fixer et activer les domaines TIR des adaptateurs des voies de signalisation des TLR (294). C'est ainsi que les voies dépendantes de Myd88 ou TRIF sont activées et conduisent à la synthèse de cytokines.

B. 2 Les différents TLR : leurs PAMPs et leurs rôles

Dix TLR ont été identifiés chez l'homme et sont exprimés par de nombreux types cellulaires dont les monocytes/macrophages. Les TLR1, 2, 4, 5, 6 sont retrouvés à la membrane plasmique alors que les TLR3, 7/8 et 9 sont localisés aux endosomes (figure 18).

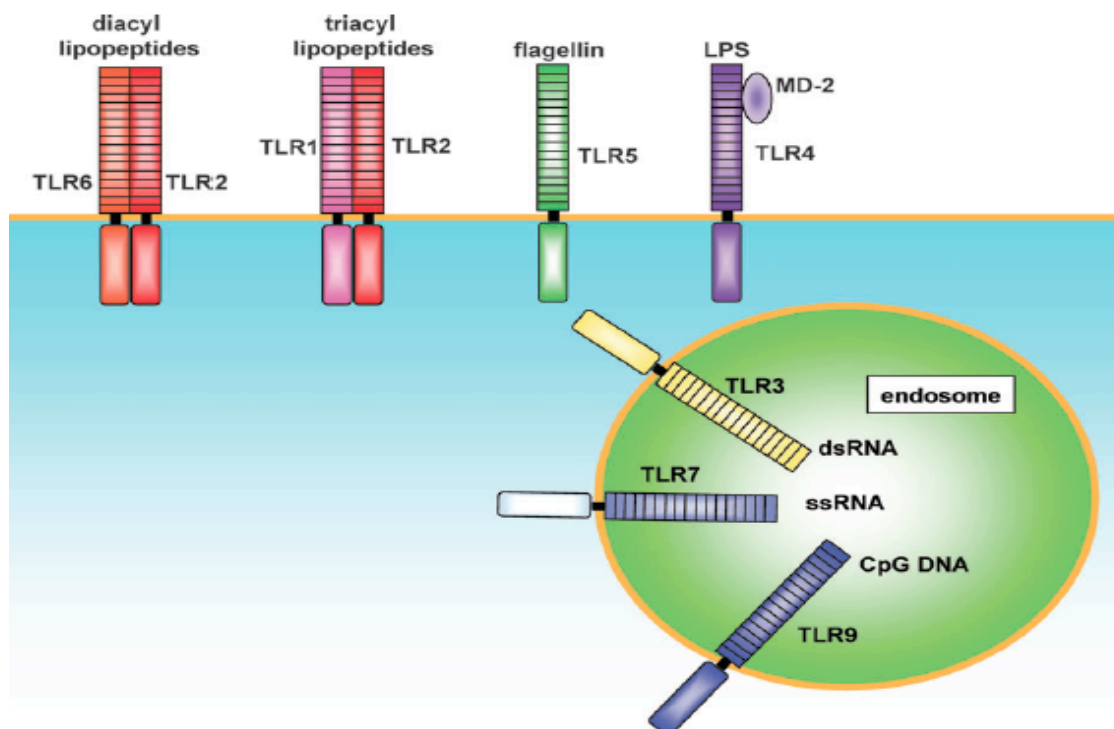


Figure 18 : Les TLRs et leurs ligands. Le TLR2 est essentiel à la reconnaissance des lipopeptides microbiens. Le TLR1 et le TLR6 coopèrent avec le TLR2 afin de discriminer respectivement les lipopeptides contenant un diacyl ou un triacyl. Le TLR4-MD2 est le récepteur du LPS. Les TLRs endosomaux, TLR3, TLR7 et TLR9, reconnaissent les ARNdb, ARNs et ADN CpG respectivement.

B. 2-a Les TLR intracellulaires/endosomaux

Les TLR3, 7/8 et 9 présentent une séquence de « rétention » au réticulum endoplasmique (RE) (figure 19). Cette séquence est localisée différemment en fonction des TLR. Sur le TLR9, c'est son ectodomaine ou sa région transmembranaire qui est suffisante pour la localisation au RE (295). Pour le TLR3 une séquence d'acides aminés (Glu727 à Asp749) dans le domaine cytoplasmique, est suffisante. Pour le TLR7 il s'agit du domaine transmembranaire. Une fois les cellules activées, ces TLR vont être transportés dans le Golgi *via* les protéines chaperonnes: PRAT4A et gp96. Ils suivront par la suite leurs trafics pour atteindre les endosomes. Cette étape est dépendante de l'association du domaine transmembranaire des TLR avec la protéine chaperonne : Unc93B1. Dans les endosomes, seul le TLR9 subit une étape supplémentaire de maturation. En effet, le clivage du TLR9 par les cathepsines est essentiel à la reconnaissance du ligand par le TLR9. Cette localisation endosomale des TLR3, 7/8 et 9 permet d'éviter leurs activations par les acides nucléiques du soi (296, 297).

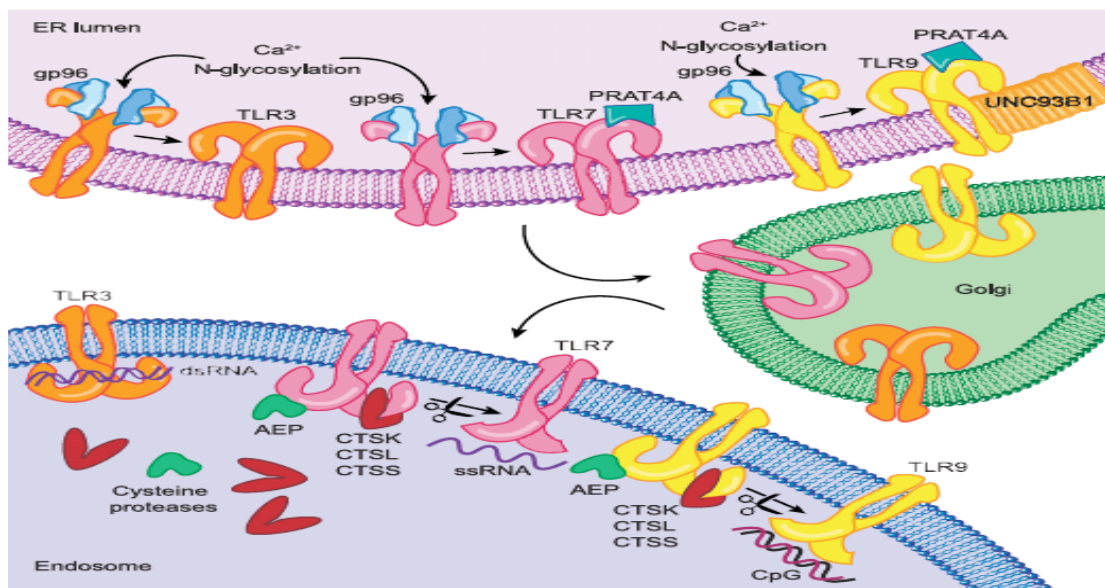


Figure 19. Trafic et « processing » des TLR intracellulaires (295). Dans le RE, la protéine chaperonne gp96 favorise le repliement des TLR3, TLR7 et TLR9. L'action de la gp96 nécessite la mobilisation du calcium du RE et une N-glycosylation essentielle pour l'interaction avec le TLR. Les protéines PRAT4A et UNC93B1 sont essentiels à l'export des TLR3, TLR7 et TLR9 du RE. Les TLR7 et TLR9 entrent en compétition pour la liaison à UNC93B1. Cependant, UNC93B1 se lie préférentiellement à la région N-terminale du TLR9. Le trafic des TLR au travers de l'appareil de Golgi suit la voie de sécrétion classique et les TLR sont acheminés vers les endosomes où ils rencontrent leurs ligands. Les ectodomains des TLR7 et TLR9 sont clivés par des cystéines protéases lysosomales telles que les cathepsines liées aux papaines (CTS) K, L et S, mais aussi une protéase apparentée à la famille des caspases : l'asparagine endopeptidase (AEP). Le clivage des TLR7 et TLR9 n'est pas nécessaire pour l'interaction avec le ligand mais reste essentiel à l'interaction avec MyD88. Le clivage du TLR3 n'a pas été observé.

Le TLR3 présent majoritairement dans les DC matures, reconnaît l'ARN double brin. Celui-ci peut être généré dans le cytosol pendant le cycle réplcatif soit comme un intermédiaire à la synthèse d'ARN soit comme un produit généré lors de la transcription de l'ADN (298).

L'ARN simple brin doit être internalisé pour être reconnu par le TLR7/8. Notamment les TLR7/8 reconnaissent les ARN sb riches en guanosines et uridines. Des molécules synthétiques sont aussi décrites comme ligands reconnus par le TLR7/8 comme l'imidazoquinoline ou la loxoribine.

L'ADN bactérien riche en motifs CpG non méthylés est reconnu spécifiquement par le TLR9. Un nouveau ligand non-ADN a été décrit pour le TLR9, il s'agit de l'Hemozoïne.

B. 2-b Les TLRs de surfaces

- Les TLR2/1, TLR2/6 et TLR5

Les TLR de surface, TLR2/1, TLR2/6 et TLR5, reconnaissent les protéines d'enveloppes virales et/ou des facteurs bactériens (296). Le TLR2 codé par 2 exons, est caractérisé par sa capacité à former des hétérodimères avec les TLR1 ou TLR6. Ces TLR1 et 6 sont codés par un seul exon, localisé en tandems sur le même chromosome. Cette hétérodimérisation confère au TLR2 une spécificité de reconnaissance avec divers ligands comme par exemple les différentes formes de LPS ou encore les triacyl et les diacyl lipopetides (299, 300). Les hétérodimères de TLR2 sont également décrits comme récepteurs de molécules fongiques/protozoaires (301) mais aussi des lipoprotéines présentes à la surface des mycobactéries (251), des méningocoques (302), ou des mycoplasmes (299). L'hémagglutinine du virus de la rougeole ainsi que les protéines virales des cytomégalo virus (HCMV), herpès virus (HSV) ou encore du virus lymphocytaire de la choriomeningite (LCMV) ont été décrits comme ligand du TLR2 (296). De manière générale, un grand nombre de ligands bactériens, fongiques et viraux ont été décrits pour le TLR2.

Le TLR5 codée par 5 exons, reconnaît uniquement la forme monomérique soluble ou bactérienne de la flagelline (303).

- Le TLR4, un TLR pas comme les autres

Le TLR4 est l'un des récepteurs membranaires les plus étudiés et les plus caractérisés. Le TLR4 est exprimé dans de nombreuses cellules immunitaires telles que les monocytes/macrophages, les DC, les neutrophiles, les mastocytes et les L_B. Le TLR4 est présent dans le Golgi où il va être pris en charge afin de subir une maturation essentielle à

son trafic. En effet, dans le Golgi le TLR4 s'associe à la Heat Shock protein gp96. La gp96 est importante puisqu'elle permet d'associer de façon calcium dépendante le TLR4 avec son cofacteur MD2. Celui ci est essentiel à l' export membranaire du TLR4, à la reconnaissance du ligand et à la signalisation du TLR4 (304). Une seconde protéine chaperonne PRAT4A s'associe au complexe TLR4-MD2 dans le Golgi et permet de suivre le routing du complexe vers le RE. Dans le RE, le complexe subit une maturation par glycosylation avant d'être exporté à la membrane plasmique où il peut reconnaître ses ligands. Le ligand le plus connu du TLR4 est le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatifs (figure 20).

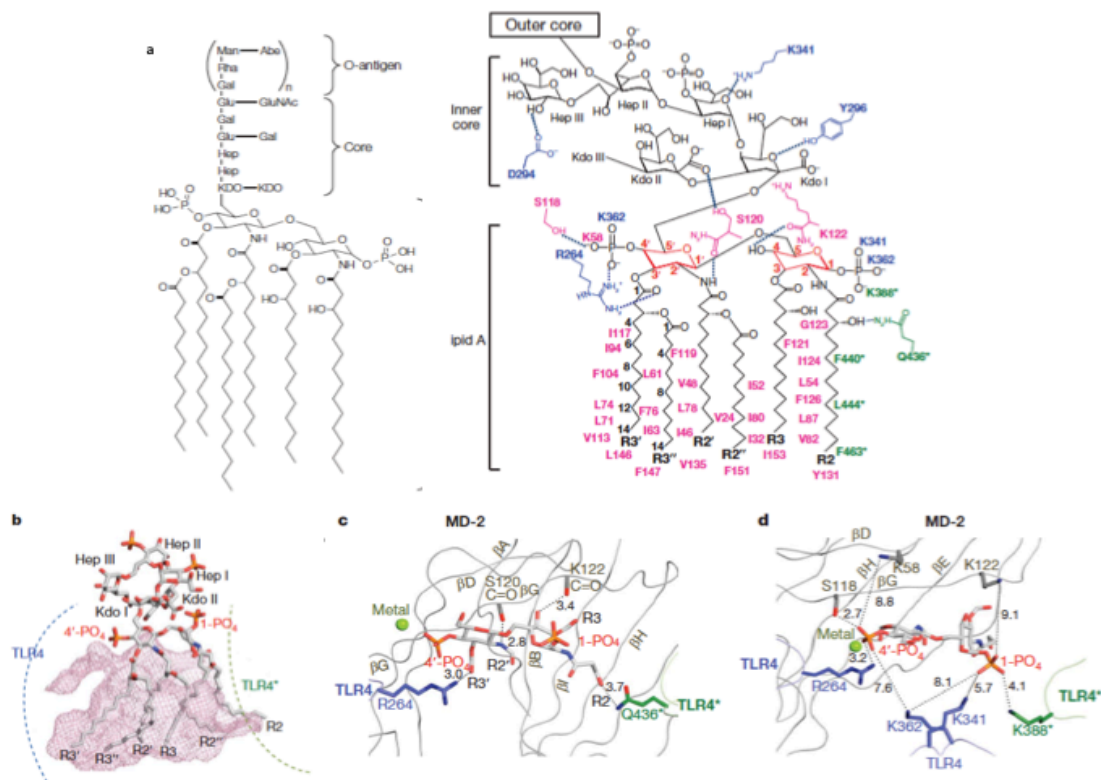


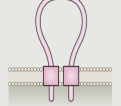

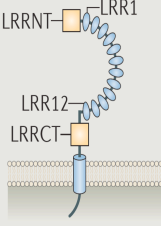
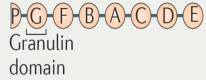


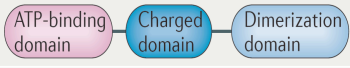
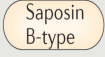
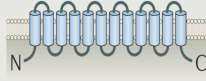
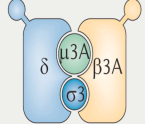
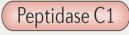



Figure 20 : Structure du lipopolysaccharide bactérien (LPS) [modifié de (291)]. a) Le LPS est composé d'un lipide A (endotoxine), d'un oligosaccharide et d'un antigène O. A droite, les carbones des glucosamines et de la chaîne lipidique du lipide A sont numérotés. Les liaisons hydrogènes sont représentés en pointillés bleu. b à d) Liaisons du LPS avec le TLR4 et le MD2. Représentations b) des interactions du LPS avec la poche du MD2, représentée en rose hachurée ; c) des liaisons hydrogènes entre le lipide A et le TLR4-MD2 ; d) des interactions ioniques et hydrogènes des deux groupements phosphates du lipide A. les distances entre les interactions sont écrites en noires en angströms.

Le LPS se compose d'un lipide A immunogène, d'un oligosaccharide de base et d'une chaîne latérale O. Le lipide A est une molécule hautement diversifiée de part le nombre et la longueur de ses chaînes latérales d'acides gras et la présence de phosphates. De nombreux travaux indiquent que la longueur et le nombre de chaînes sont essentielles à la diversité

d'activation du TLR4. En effet, en modifiant le nombre ou la longueur des acides gras ou encore en modifiant la charge du lipide A, on peut réduire l'ampleur de l'activation du TLR. La reconnaissance du LPS fait intervenir plusieurs molécules favorisant sa liaison au TLR4. En effet, le LPS est transféré au MD2 par 2 protéines accessoires, la LBP (LPS Binding protein) et le CD14. Le LPS se lie tout d'abord à la LBP qui l'extrait des membranes bactériennes afin de le transférer au CD14 soluble ou membranaire. L'interaction LPS-CD14 est de forte affinité. Des études ont montré que le domaine N-terminal de la LBP est responsable de l'interaction avec le LPS, alors que le domaine C-terminal serait quant à lui responsable du transfert du LPS au CD14. Une fois lié au LPS le CD14, présent aux rafts, recrute le TLR4 associé à son cofacteur MD-2 puis transfère le LPS au MD2. Les rôles des cofacteurs des TLR dans la reconnaissance des ligands sont décrits dans le tableau suivant (tableau 3).

Tableau 3 : Les protéines accessoires des TLR (305)

Name	Protein domain structure	Localization	Interacting TLR	Interacting ligand	Refs
Mediators of ligand delivery and/or recognition					
LBP		Secreted	None demonstrated	LPS	12
MD2		Plasma membrane	TLR4	LPS	19–21
CD36		Plasma membrane, Golgi	TLR2, TLR4, TLR6	FSL1, LTA, oxLDL, amyloid- β fibrils	23,26, 99–101
CD14		Secreted, plasma membrane (GPI-linked), endolysosomes	TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9	LPS, peptidoglycan, Pam ₃ CSK ₄ , polyI:C, CpG DNA	14,23,29–31, 102,103
TRIL		Plasma membrane, early endosomes	TLR3, TLR4	LPS	41,42
Progranulin		Secreted, endolysosomes	TLR9	CpG-A, CpG-B, CpG-C and inhibitory ODNs	45
HMGB1		Nucleus, cytoplasm, can be secreted following TLR ligation	TLR9, possibly TLR3 and TLR7	CpG-A ODNs, CpG-B ODNs, DNA, RNA	48,49,53
LL37		Early endosomes	Possibly TLR7 and TLR9	Mammalian DNA, mammalian RNA	54,57
Chaperones					
GRP94		ER	TLR1, TLR2, TLR4, TLR9	None demonstrated	58,60,62,64
PRAT4A		ER	TLR1, TLR2, TLR4, TLR9	None demonstrated	64–67
Molecules that facilitate the trafficking of endosomal TLRs					
UNC93B1		ER, endolysosomes	TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR13	None demonstrated	68,70,71
AP3		TGN, endolysosomes, LROs	TLR9	None demonstrated	75
TLR-processing enzymes					
Cathepsins		Endosomes, lysosomes	TLR9, possibly TLR3 and TLR7	None demonstrated	79,80,84
AEP		Endosomes, lysosomes	TLR9, possibly TLR3 and TLR7	None demonstrated	83,84

AEP, asparagine endopeptidase; AP3, adaptor protein 3; BPI1, BPI/LBP/CETP N-terminal domain; BPI2, BPI/LBP/CETP C-terminal domain; ER, endoplasmic reticulum;

De façon intéressante, plusieurs laboratoires ont montré qu'une région du CD14, proche de la poche de liaison au LPS, est essentielle à la signalisation induite par le LPS mais pas à sa reconnaissance (306-308). Cette zone, essentielle à la signalisation du LPS, peut établir un contact direct et transitoire avec le TLR4-MD2 et reste nécessaire au transfert efficace du LPS au MD2. Le MD2 a une structure composée de 2 feuillets β antiparallèles qui forment une large poche hydrophobe permettant la liaison du ligand (309). Le LPS se lie directement à cette poche et induit la dimérisation du complexe TLR4-MD2. Pour la dimérisation, le TLR4 forme des ponts hydrophobes et hydrophiles directement avec le LPS et les F126 et F87 de la boucle du MD2. Les F126 et F87 du MD2 lient respectivement les brins β G- β H et β E- β F du MD2. L'équipe de Miyake et coll. ont aussi découvert que la F126 et la Gly129 du MD2 étaient essentielles à l'agrégation du complexe TLR4-MD2 (310). Les principales interactions entre le TLR4-MD2, le LPS-MD2 et le LPS-TLR4, impliquées dans la dimérisation du TLR4-MD2 après fixation du ligand sont résumés dans la figure 21.

La phosphorylation du LPS est importante pour l'activité biologique de ce dernier. En effet, le lipide A diphosphorylé est 1000 fois plus actif que le lipide A monophosphorylé (311). C'est ainsi que de nombreux dérivés synthétiques du lipide A ont été développés comme candidats thérapeutiques pour les chocs septiques et les septicémies. Notamment l'Eritoran ou E5564, une molécule synthétique dérivée du lipide A de *Rhodobacter sphaeroides*, est utilisée comme antagoniste du TLR4-MD2. Ce lipide est actuellement testé en phase clinique III pour le traitement des chocs septiques. Le lipide IVa, encore appelé composé 406, est un intermédiaire retrouvé lors de la biosynthèse du LPS. Ce composé est aussi utilisé comme antagoniste. Cependant, on note la découverte de nombreux autres ligands du TLR4 dans la littérature. C'est le cas notamment de nombreuses protéines endogènes telles que la fibronectine, les défensines, le hyaluronate ainsi que les héparanes sulfates. Le Taxol ayant des activités anti-tumorales chez l'homme a aussi été décrit comme ligand du TLR4. Diverses protéines virales ont également été décrites comme liant et activant le TLR4 et/ou ses cofacteurs. Comme la protéine de fusion du virus syncytial (RSV) (282), la glycoprotéine d'enveloppe du MMTV (281), la protéine G du VSV ainsi que la protéine p30 du HTLV (283). Après activation par ses ligands, le TLR4 est le seul TLR à pouvoir initier les 2 voies de signalisations décrites pour les TLR intracellulaires et membranaires, à savoir la voie dépendante de TRIF et la voie dépendante de Myd88 (312)(313).

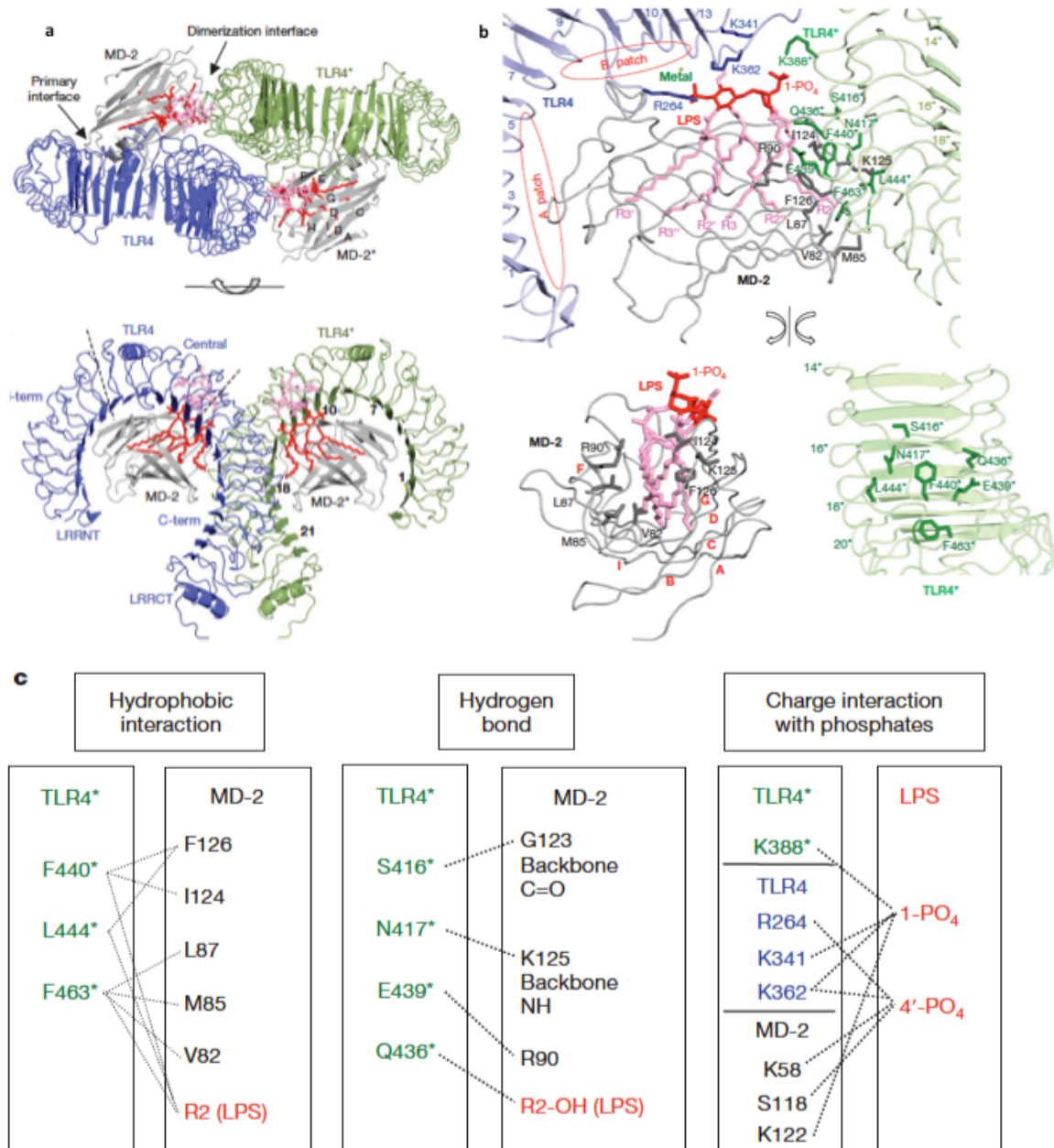


Figure 21 : Représentation de la dimérisation du complexe TLR4-MD2-LPS (313). A) L'association entre le TLR4 et le MD2 est formée avant la liaison du LPS. La dimérisation est induite suite à la liaison avec le LPS. Le lipide A du LPS est représenté en rouge et son carbohydrate en rose. Les numéros des LRR du TLR4 et le nom des chaînes β du MD2 sont représentés en noir. Le TLR4 est divisé en domaine N-ter, central et C-ter. B) Par souci de clarté, le noyau interne du LPS n'est pas représenté. L'interface principale est représentée en « patch » A et B marqués en rouge. L'interface de dimérisation a été tournée pour montrer les résidus impliqués dans la dimérisation. C) Les acides aminés impliqués dans les interactions avec le LPS et la dimérisation du complexe TLR4-MD2-LPS. Les numéros des LRR du TLR4 et les brins β du MD2 impliqués dans la dimérisation sont marqués en vert et rouge respectivement. Les partenaires d'interactions sont reliés entre eux par des traits en pointillés.

B. 3 Les voies de signalisation des TLR

Après fixation du ligand et dimérisation des TLR, une signalisation dépendante de Myd88 (sauf pour le TLR3) et/ou indépendante de Myd88 (TLR3 et 4) peut être induite. Ces voies font intervenir 4 adaptateurs fonctionnels : Myd88 (Myeloïde differentiation primary response protein 88), TIRAP (TIR domain containing Adaptator Protein), TRIF (TIR domain containing adaptator inducing IFN- β) et TRAM (Trif-related adaptator molecule) (314) (figure 22).

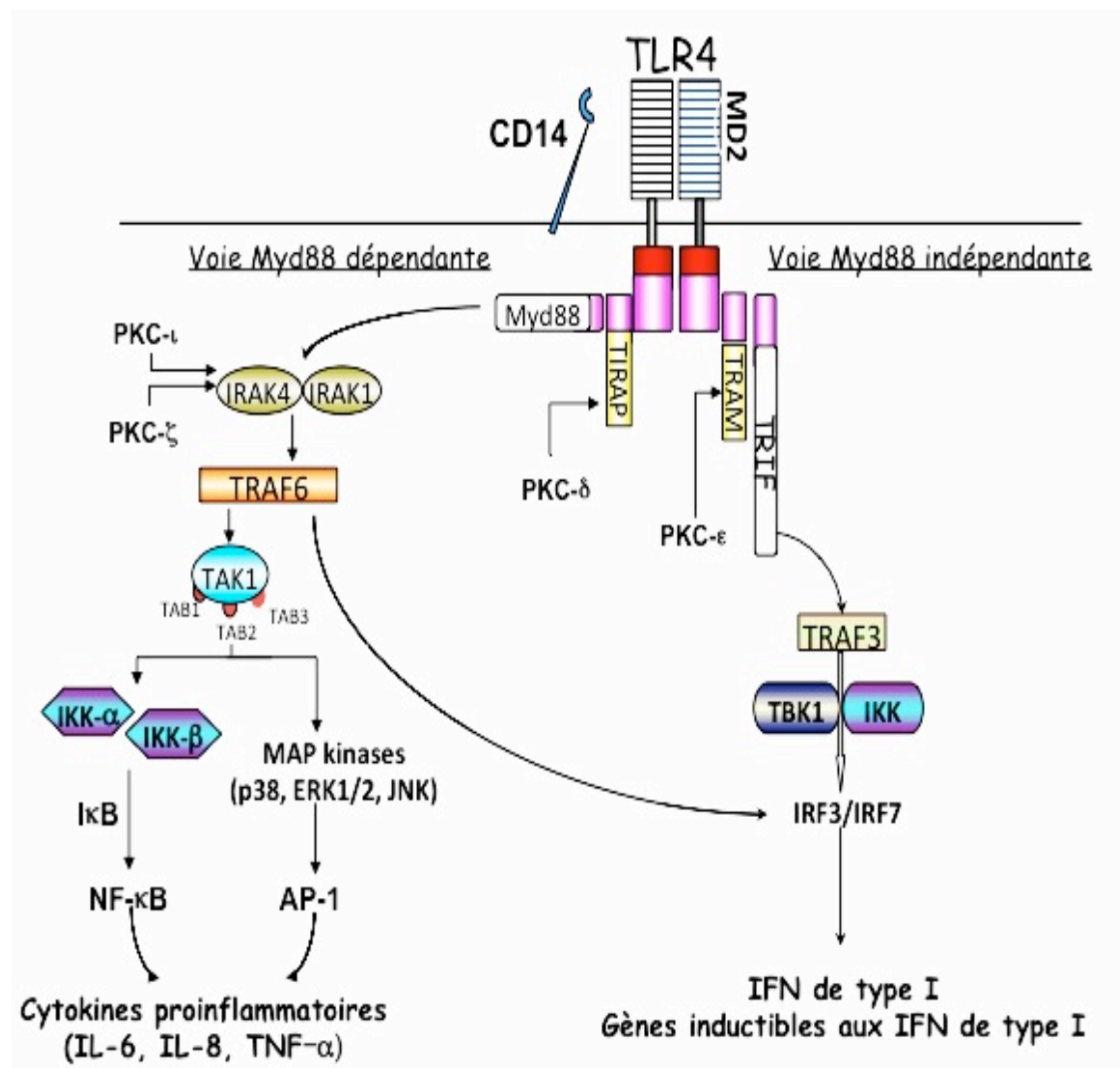


Figure 22. Schéma des voies de signalisations activées par le TLR4. Représentation des différentes cascades de signalisation activées suite à l'activation du TLR4 par le LPS, son ligand principal. Deux voies de transductions peuvent être activées par le TLR4. Le recrutement de la molécule adaptatrice MyD88 par l'adaptateur TIRAP ou de la molécule TRIF via la molécule adaptatrice TRAM induit respectivement la voie dépendante de MyD88 ou indépendante de MyD88, encore appelé TRIF.

B. 3-a La signalisation dépendante de Myd88

La signalisation dépendante de Myd88 est présente chez tous les TLR sauf le TLR3. Elle consiste en le recrutement de l'adaptateur Mal encore appelé Tirap à la membrane. Mal est recrutée et associée par son domaine N-terminal au PIP2 membranaire (315). La phosphorylation de Mal par la Btk (Burton tyrosine kinase) (316) engage alors l'association de l'adaptateur Myd88 à Mal au niveau membranaire et induit la cascade de signalisation. Cependant, des travaux semblent indiquer que Mal pourrait induire un signal indépendamment de Myd88, car il possède un domaine de recrutement de TRAF6 (317, 318). La signalisation dépendante de Myd88 entraîne le recrutement des kinases de la famille IRAK et TRAF6. Le complexe TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 ainsi formé, active d'une part le complexe IKK de la voie NF- κ B et d'autre part les MAP kinases p38, ERK1/2 et JNK de la voie AP-1. Ces molécules de signalisation conduisent, au final, à l'expression de cytokines pro-inflammatoires (figure 22).

B. 3-b La signalisation dépendante de TRIF

La signalisation indépendante de Myd88 encore appelé dépendante de TRIF, est uniquement activée pour le TLR3 endosomal et le TLR4 membranaire. Cette dernière fait intervenir l'adaptateur TRAM et le recrutement de TRIF. Récemment, il a été montré que l'adaptateur TRAM est localisé dans les endosomes. Cette localisation dépend de sa myristoylation et permet la liaison et l'activation de la voie TRIF (319). Cette myristoylation est aussi dépendante de la phosphorylation de la Ser16 de TRAM par la PKC- ϵ (277). De plus, il a été montré que le TLR4 est endocyté de manière Syk, PLC- γ 2 dépendante (320). En effet, il a été montré que la seule expression du CD14 était suffisante à induire l'endocytose du TLR4. Cette signalisation mène alors à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 nécessaires à l'induction des IFN de type I, permettant de prévenir et contrôler le développement d'infections virales (figure 22). De nombreux travaux indiquent aussi l'implication des PKC- ϵ , PKC- δ , PKC- ζ et PKC- ι dans la régulation de la signalisation du TLR4 (277, 279, 280). Cependant, peu de travaux se sont penchés sur les rôles et les mécanismes d'activations des PKC dans la voie des TLR.

B. 4 Régulation de l'activation des TLR

L'activité des TLR est hautement régulée. En effet, des signaux prolongés des TLR pourraient entraîner une hyperactivation et/ou une immunosuppression dangereuse pour l'organisme. Plusieurs systèmes de régulations négatifs des TLR ont été rapportés (321) et sont classés en 5 catégories : 1) les leurres solubles ; 2) les régulateurs intracellulaires ; 3) les régulateurs transmembranaires ; 4) les systèmes de régulation de l'expression des TLR et enfin 5) la régulation des effets des TLR par apoptose des cellules. Ces systèmes de régulations vont cibler soit le TLR directement soit ses adaptateurs ou molécules de signalisation. Par leurs mécanismes, ces systèmes préviennent ou inhibent la production de cytokines et donc une activation délétère pour l'organisme.

B. 4-a Les leurres solubles

On retrouve dans l'organisme de nombreux ARN messagers codants pour les TLR, notamment les TLR2 et TLR4. Ceci indique alors la présence de plusieurs isoformes circulants des TLR4 et TLR2. En effet, l'équipe de Iwami et al. a découvert chez la souris un isoforme de TLR4 dont 86 acides aminés sont identiques au domaine extracellulaire du TLR4 et 36 acides aminés présentent 70% d'homologie avec le domaine N-terminal de la PI3K (322). Cette forme soluble du TLR4 (sTLR4) inhibe l'activation de NF- κ B et la production de TNF- α induite par le LPS. Cependant, peu de travaux se sont penchés sur les mécanismes précis de cette inhibition. Il semblerait que le sTLR4 inhibe l'interaction du TLR4 avec ses cofacteurs MD2 et CD14. Un second isoforme sTLR2 est produit de façon continue par les monocytes et interagit avec le ligand pour inhiber la production de TNF- α et d'IL-8 par le TLR2 membranaire (323). Ces isoformes circulants représentent la première ligne de régulation négative des TLR, en agissant directement sur l'activation des TLR (figure 23).

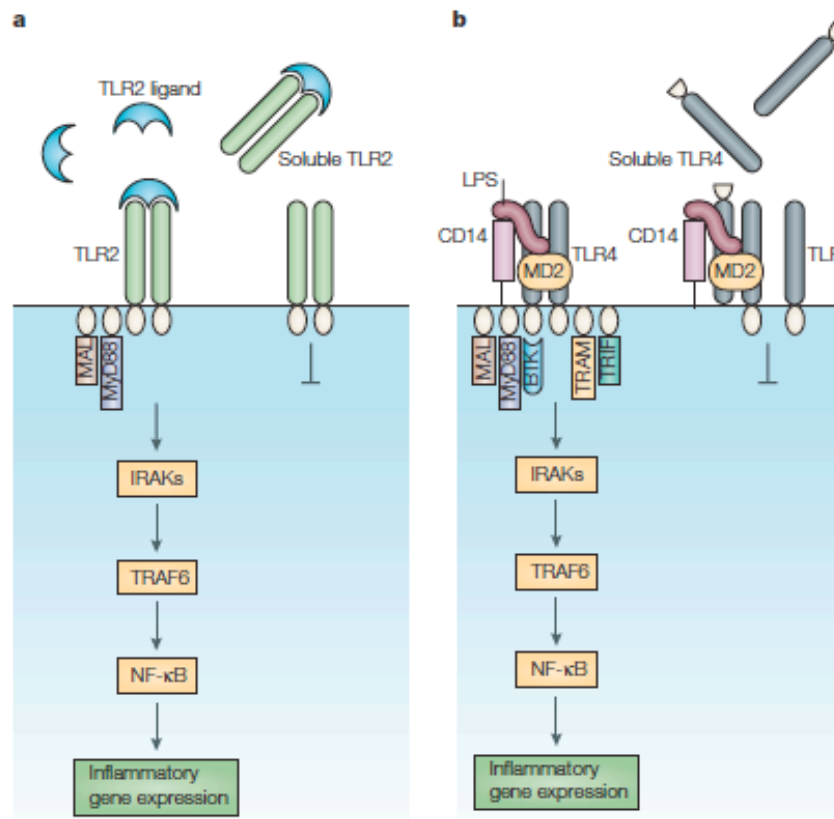


Figure 23. Régulateurs solubles des TLR (321). Les formes solubles des TLR forment la première ligne de régulation de la signalisation des TLR. a) Le TLR2 soluble entre en compétition avec le TLR2 membranaire pour la fixation du ligand microbien. Cette compétition prévient la fixation du ligand au TLR2 membranaire et inhibe l'activation et la signalisation du TLR2. b) Les cofacteurs du TLR4, CD14 et MD2, sont nécessaire à la reconnaissance du LPS et la signalisation induite suite à cette dernière. Le soluble TLR4 peut interagir avec MD2, inhibe la formation du complexe TLR4-MD2 et la signalisation induite par l'interaction TLR4-LPS.

B. 4-b Les régulateurs transmembranaires

Des régulateurs transmembranaires ont aussi été découverts. C'est notamment le cas de ST2L, SIGIRR et TRAILR (figure 24).

* ST2L est un récepteur orphelin. C'est une protéine transmembranaire de type I exprimée majoritairement dans les organes hématopoïétiques et plus particulièrement dans les cellules Th2. Par sa proline du domaine TIR, ST2L agit en interagissant et séquestrant MyD88 et Mal. C'est ainsi que ST2L inhibe l'activation des voies Myd88 des TLR.

*SIGIRR est une protéine membranaire constituée d'un domaine extracellulaire type immunoglobuline et un domaine TIR cytoplasmique. Tout comme ST2L, SIGIRR est un récepteur orphelin, exprimé par les cellules épithéliales et les DC immatures mais pas les

macrophages. SIGIRR peut interagir avec le TLR4 et aussi IRAK et TRAF6 inhibant ainsi leurs activations.

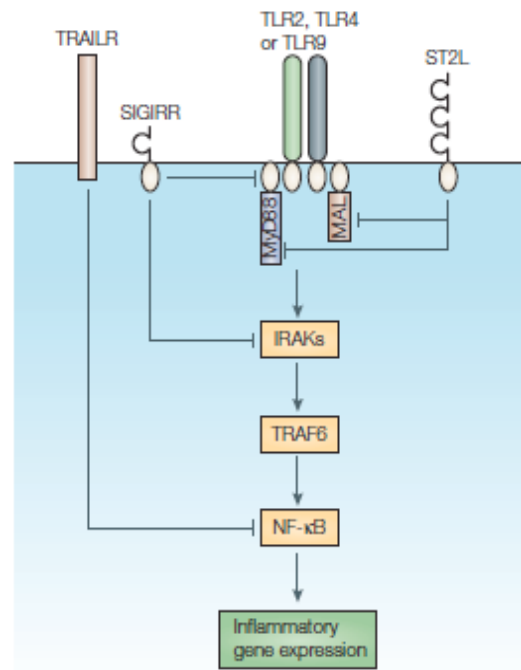


Figure 24. Les régulateurs transmembranaires des TLR (321). La signalisation des TLR peut être contrôlée par des régulateurs associés aux membranes plasmiques. ST2L interagit avec Myd88 et Mal et séquestre NF-κB activé par la voie Myd88 (TLR2, TLR4, TLR9). SIGIRR lie le TLR4 et IRAK et met fin à la cascade de signalisation en aval. ST2L et SIGIRR n'affecte pas la voie dépendante de TRIF. Au contraire, TRAILR inhibe l'activation de NF-κB en stabilisant/inhibant la dégradation de Iκ-B. TRAILR affecte à la fois les voies dépendantes de Myd88 et/ou de TRIF.

B. 4-c Les régulateurs intracellulaires

Une fois les TLR activés, un autre mécanisme de régulation peut être mis en jeu par l'organisme et cible cette fois ci, directement les molécules/adaptateurs des voies de signalisations. Ces régulateurs sont : IRAK-M, Tollip, MyD88s, A20, PI3K et SOCS1 (figure 25).

* IRAK-M inhibe les kinases de la famille IRAK. Plus particulièrement, il inhibe la formation du complexe IRAK1-TRAF6 en inhibant la dissociation de IRAK1 à IRAK4 ou en stabilisant le complexe TLR-Myd88-IRAK4. Au vue de sa localisation préférentielle chez les leukocytes, l'action d'IRAKM reste limitée. Malgré que ce dernier n'apparaisse pas comme un régulateur « universel » des TLR, 4 isoformes de IRAK2 ont été découverts chez la souris. Ils inhibent l'activation de NF-κB par le TLR4. Il s'agit des IRAK2a, IRAK2b, IRAK2c et IRAK2d (figure 25).

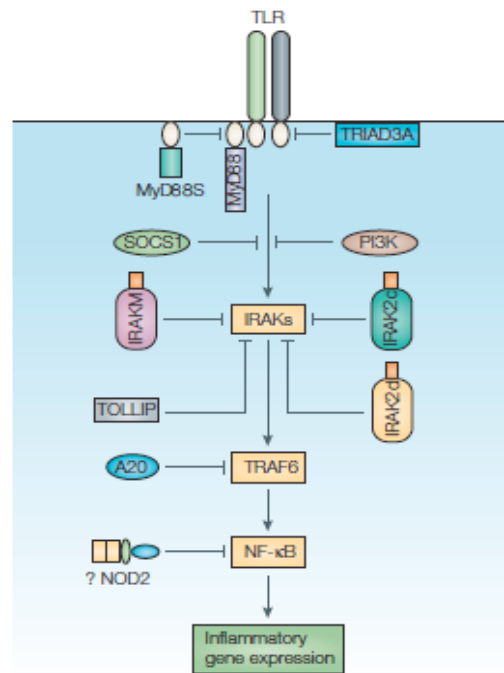


Figure 25. Régulateurs intracellulaires des TLR (321). Les voies de signalisation des TLR sont strictement régulées par des régulateurs endogènes. TRIAD3A favorise l'ubiquitination et la dégradation de certains TLR, alors que Myd88s (forme courte de MyD88) est un antagoniste de MyD88 et antagonise donc les fonctions de Myd88. Les protéines inhibitrices comme SOCS1, IRAKM, Tollip, IRAK2c et IRAK2d inhibe IRAK en ciblant différentes étapes dans les voies de signalisation des TLR. La PI3K régule négativement les réponses TLR par un mécanisme encore inconnu. La protéine A20, elle, déubiquitine TRAF6 et inhibe à la fois la voie MyD88 dépendante et indépendante. NOD2 pourrait inhiber la signalisation TLR2 en inhibant le facteur de transcription NF-κB.

* Tollip est également un régulateur négatif de l'activation des IRAK. En effet, Tollip interagit avec IRAK1 et inhibe son autophosphorylation. De façon intéressante, c'est IRAK1 lui-même qui phosphoryle et active Tollip. Il semblerait que ce soit la phosphorylation de Tollip qui facilite l'accès et l'ubiquitination de l'adaptateur IRAK1. L'action régulatrice de Tollip passerait par la capacité de son domaine « C2 like », en N-terminal à s'associer avec le PIP2 membranaire (figure 25). Le mécanisme d'action précis reste encore méconnu.

* MyD88s est une forme « courte » de Myd88 endogènes. Elle est retrouvée de façon ubiquitaire dans la rate et de façon moins prononcée dans le cerveau. Il apparaît que Myd88s soit aussi exprimé dans les lignées monocytaires suite à leurs stimulations par le LPS. Myd88s tronqué ou soluble s'associe avec Myd88 pour former un hétérodimère et rentre en compétition avec l'activation des homodimères endogènes. Ainsi, Myd88s inhibe l'activation de Myd88 et prévient l'activation de IRAK1 (figure 25).

* A20 fut initialement décrit comme une « TNF induced zinc finger protein » responsable de l'inhibition de l'activation de NF- κ B induite par le TNF. L'enzyme A20 est une cystéine protéase qui a pour but de désubiquitiner TRAF6 et d'inhiber l'activation de NF- κ B. A20 est le seul régulateur capable d'inhiber la voie dépendante de Myd88 et de TRIF (figure 25).

* La PI3K est constitutivement exprimée par la plupart des cellules. Elle est constituée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Des expériences réalisées chez la souris ont permis de montrer que les souris déficientes pour la sous-unité p85 présentaient une très forte activation de la signalisation TLR avec une réponse IL-12 et Th1 prédominante. Cette action de la PI3K ferait certainement intervenir une suppression des voies p38, JNK, ERK et NF- κ B (figure 25).

* Les protéines SOCS1 (Suppressor Of Cytokines Signaling 1) et SOCS3 font partie d'une famille de 8 membres (CIS et SOCS1 à SOCS7). Tous sont connus comme des régulateurs majeurs des voies de signalisations induites par les cytokines. Les protéines SOCS sont composées d'un domaine SH2 et d'un domaine C-terminal comprenant une « SOCS box » de 40 acides aminés, nécessaire à leurs activités de dégradation via l'ubiquitylation (figure 26a). La « SOCS box » interagit avec l'élongin B et C, la cullin 5 et la RING-box 2 (RBX). Ces derniers, recrutent la E3 ubiquitine transférase. Ainsi, les protéines SOCS, tout comme les protéines contenant une « SOCS box », fonctionnent telles que des E3 ubiquitine ligases en s'associant avec les protéines cibles et en induisant leurs dégradations. C'est le domaine SH2 des SOCS qui permet de cibler les protéines à dégrader. Les SOCS1 et SOCS3 sont les plus étudiées. Elles possèdent, en plus de la boîte SOCS, un domaine N-terminal contenant une région inhibitrice KIR (Kinase Inhibitory Region). Cette action inhibitrice, passe par la capacité des domaines KIR à interagir et à fonctionner comme un pseudosubstrat des kinases JAK (figure 26b). Ainsi, les protéines SOCS1 et SOCS3, peuvent inhiber l'activité des tyrosines kinase JAK et inhiber les phosphorylations du récepteur ou des STAT en aval. Le domaine SH2 de SOCS3 contient aussi une région de 35 résidus non structurés contenant un motif d'insertion PEST (Proline, Glutamate, Serine et Thréonine). Ce motif est nécessaire pour inhiber STAT3 et augmenter le « turnover » et la stabilité de SOCS3.

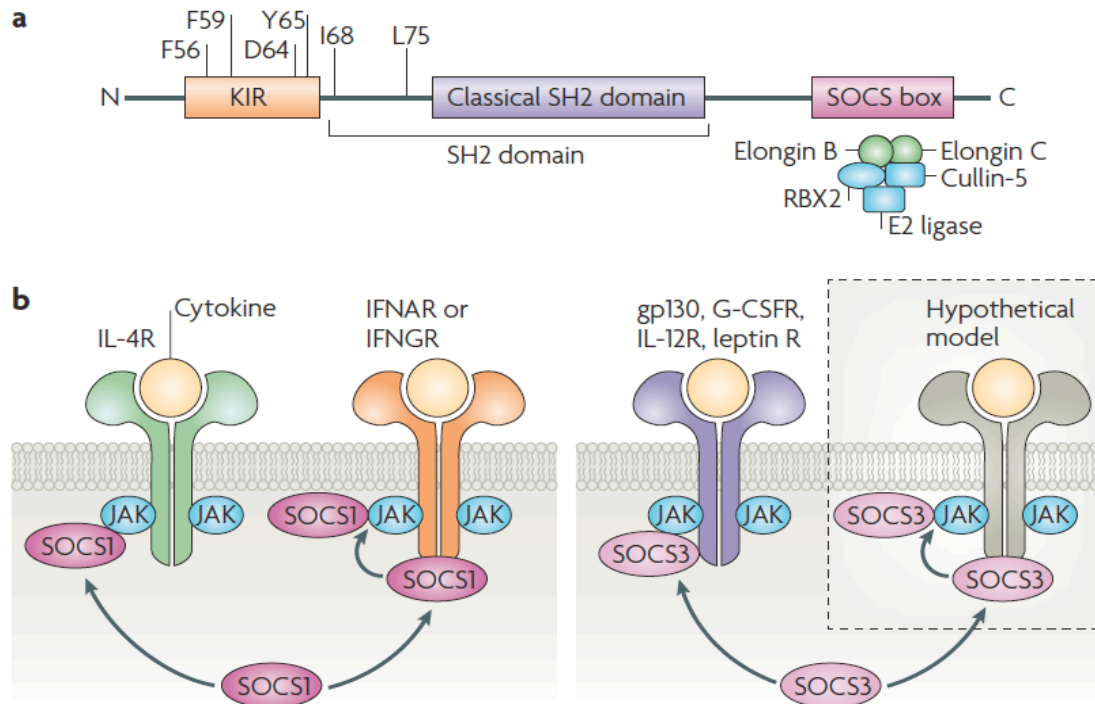


Figure 26. Structure et fonction des SOCS (324). **a-** Structure de SOCS1. La « SOCS box » est conservée dans toute les protéines contenant un domaine d'homologie SRC (SH2 domaine). Elle recrute le système ubiquitine transférase et interagit avec un complexe comprenant l'elongine B et C, la cullin-5, la RING box-2 (RBX2) et la ligase E2. Les SOCS fonctionnent telles que des E3 ubiquitine ligases. Elles dégradent les protéines cibles en s'associant avec. Elles peuvent aussi cibler les récepteurs aux cytokines, les JAK kinases et les SOCS elles-mêmes à la dégradation protéasomique. SOCS1 et SOCS3 peuvent inhiber l'activité des JAK kinases par leurs domaines KIR. **b-** Rôles des protéines SOCS1 et SOCS3. SOCS1 peut directement, par le domaine KIR, interagir avec le domaine catalytique de la JAK kinase. SOCS1 interagit, avec une forte affinité, avec le récepteur aux IFN (IFNR) ou à l'IFN- γ (IFNGR). Par conséquent, SOCS1 peut lier en premier lieu le récepteur aux IFN et dans un second temps interagir et inhiber les JAK. Le domaine SH2 de SOCS3 lie principalement la Tyr57 phosphorylée des récepteurs liés à la gp130. Leptin R : Leptin Receptor.

De nombreux travaux se sont intéressés à l'expression des protéines SOCS3 et SOCS1 induite par les ligands des TLRs tels que le LPS ou l'ADN CpG. Cette expression de SOCS1 et SOCS3 permet d'inhiber la signalisation des TLR activés et ainsi éviter les chocs septiques. SOCS1 et SOCS3 peuvent agir à plusieurs niveaux (figure 26). Notamment, SOCS1 peut inhiber la sous-unité p65 de NF- κ B en facilitant son ubiquitination et sa dégradation. SOCS1 se lie aussi à la protéine phosphorylée Mal/Tirap *via* son interaction avec la Btk (Burton tyrosine kinase). Suite à cette interaction, SOCS1 ubiquitine et dégrade Mal et par conséquent inhibe la phosphorylation de la sous-unité p65 et l'activation de NF- κ B. SOCS1 peut aussi réguler la voie des MAP kinases JNK et p38 en liant et inhibant la kinase activatrice des MAP kinases : ASK1. L'activation de la voie TRIF elle, permet la production d'IFN- β qui, une fois sécrété, va à son tour activer le récepteur aux IFN et la voie JAK/STAT1. SOCS1 inhibe cette voie JAK-STAT1. Des études montrent aussi la capacité de la protéine

SOCS1 à inhiber la voie JAK2-STAT5 impliqué dans la sécrétion d'IL-6 par le LPS. SOCS3 est un régulateur important de l'activité de l'IL-6 et de l'IL-10 (figure 27).

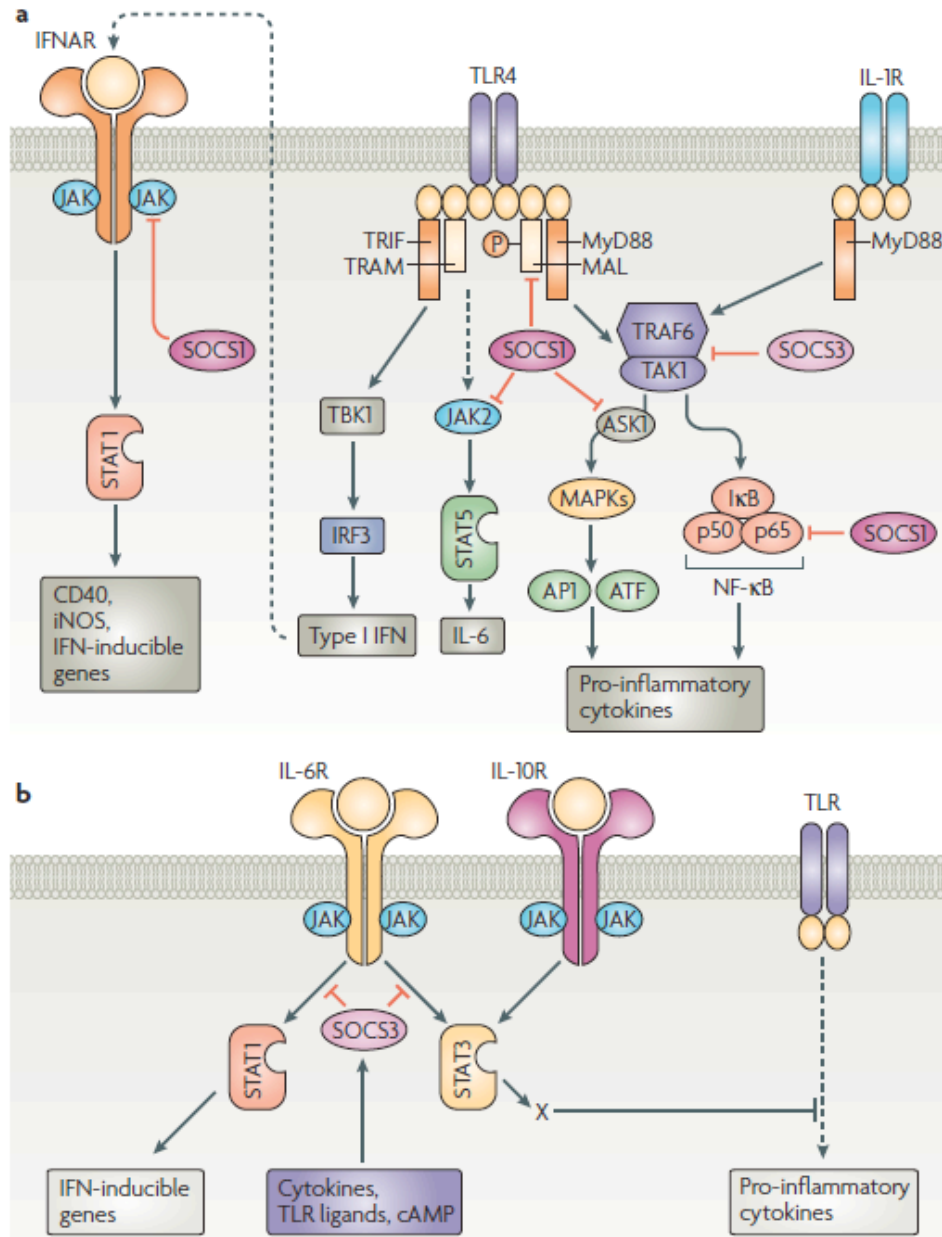


Figure 27. Inhibition des voies TLR, IFN et IL-1R par les protéines SOCS1 et SOCS3 (324). L'activation du TLR4 par le LPS induit l'activation des adaptateurs Mal et Myd88 (voie dépendante de Myd88) et des adaptateurs TRAM et TRIF (voie dépendante de TRIF). Les signalisations NF-κB et MAP kinases sont activés par TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) et TAK1 (TGF-β activated kinase 1) suite à l'activation de la voie Myd88. La voie IFN et notamment IRF3 (IFN regulatory factor 3) est activé par la voie dépendante de TRIF. L'IFN-β est induit par les voies TRIF-IRF3 et JAK-STAT1. La voie JAK2-STAT5 est aussi activé par le LPS. Elle est responsable de la production d'IL-6. SOCS1 inhibe la voie JAK-STAT. Elle interagit aussi avec l'adaptateur Mal phosphorylé et la sous-unité p65 de NF-κB pour induire leurs dégradations protéasomique. L'IL-1 active Myd88 qui à son tour active TRAF6 et TAK1. SOCS3 inhibe l'activation de NF-κB en inhibant l'association TRAF6-TAK1. b- Inhibition de la signalisation TLR par SOCS3. SOCS3 supprime l'activation de STAT3 via la sous-unité gp130 du récepteur à l'IL-6 (IL-6R). SOCS3 n'inhibe pas le récepteur à l'IL-10.

Ces cytokines, IL-6 et IL-10, et la prostaglandine E2 augmente l'expression de SOCS3 dans les cellules. Elle inhibe aussi l'activation des TLR en inhibant TRAF6 et TAK1, qui sont tout les deux cruciaux pour l'activation du TLR et la réponse induite par l'IL-1. Des travaux ont aussi montré la capacité de SOCS2 à inhiber la maturation des DC induite par le LPS. Cette action passerait par la capacité de SOCS2 à inhiber la signalisation dépendante et indépendante de Myd88 (325).

B. 4-d La modulation de l'expression des TLR

Un important mécanisme de régulation par lequel la signalisation des TLR peut être inhibée est la diminution de l'expression des TLR en surface, suivie de leurs dégradations.

* C'est notamment le cas des E3 ligases appartenant à la famille des TRIAD3. Triad3A est le composant majoritaire de cette famille. Elle agit en interagissant avec les domaines cytoplasmiques des TLR9 et TLR4 mais pas du TLR2, afin de promouvoir leurs internalisations, ubiquitinations et leurs dégradations (326).

* La production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β peuvent aussi induire la diminution de l'expression des TLR. En effet, en plus d'inhiber la production de cytokines inflammatoires, l'IL-10 tout comme le TGF- β , inhibent l'expression des TLR. Le TGF- β peut aussi diminuer l'expression de Myd88 suite à son ubiquitination.

B. 4-e La régulation des TLR par apoptose des cellules

Les TLR peuvent aussi agir comme des récepteurs de morts afin d'induire l'apoptose des cellules présentant une réponse TLR dérégulée. En effet, Myd88 possède un « death domain » lui permettant d'activer les FADD et la caspase 8 responsables de l'apoptose des cellules. Une apoptose Myd88 indépendante des cellules peut aussi être observée. Notamment, elle ferait intervenir l'activation de la PKR par la voie TRIF mais aussi l'apoptose caspases indépendantes.

C. Le détournement des TLR par les virus

Pour certains virus, l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppes et les TLR est un moyen de détourner la réponse immunitaire au profit du virus. Ceci, dès le contact avec la cellule et sans même l'expression des gènes viraux. On retrouve alors des virus qui possèdent la capacité d'inhiber l'activation des TLR. D'autres données, montrent que certains virus sont capables d'échapper au système immunitaire en agissant sur la mise en place de la réponse innée par exemple en interférant directement avec les TLR ou encore avec les voies de transductions activées par ces récepteurs.

En effet, il apparaît que de nombreux virus sont capables d'inhiber directement la transduction du signal passant par les TLR, empêchant ainsi l'activation efficace de la réponse antivirale (296). Par exemple, la protéine A46R du virus de la vaccine interfère avec les voies de signalisation dépendante et indépendante de MyD88 par son domaine TIR (327). Elle participerait ainsi à la virulence du virus. Aussi, la protéine NS5A du virus de l'hépatite C est coimmunoprécipitée avec la molécule adaptatrice MyD88. Elle inhibe la voie d'activation dépendante de MyD88 dans les macrophages de souris (328). La modulation de la réponse immunitaire par NS5A pourrait en partie expliquer la chronicité de l'infection, caractérisée par une faible réponse des cellules T CD4 et CD8.

D'autres virus sont capables de détourner l'activation des TLR pour favoriser leur entrée dans les cellules cibles ou favoriser leur persistance dans l'organisme. Effectivement, les TLR peuvent être utilisés comme récepteurs ou comme inducteurs de récepteurs viraux (283). Par exemple, l'interaction du virus de la rougeole avec le TLR2 à la surface des monocytes, induit l'expression de SLAM (CD150) qui est aussi son propre récepteur d'entrée virale. Le cas du rétrovirus murin MMTV, est aussi intéressant dans la mesure où l'activation du TLR4 par ce virus conduit indirectement à la sécrétion d'IL-10 par les cellules B, diminuant la réponse antivirale (283) et permettant sa persistance.

Enfin, de façon importante, de nombreux pathogènes détournent l'activation des TLR pour échapper au système immunitaire ou se répliquer. D'autres données montrent que certains virus sont capables d'échapper au système immunitaire en agissant sur la mise en place de la réponse innée. Par exemple en interférant directement avec les TLR ou encore avec les voies de transduction activées par ces récepteurs. En effet, plusieurs virus tels que le MMTV par sa protéine Env (281), le RSV par sa protéine F (282), le virus VSV par sa protéine G (283) et les coxsackie virus sont capables de stimuler la production de cytokines

dont l'IL-10 et le TNF- α par le TLR4. Le TNF- α produit contribue à la réplication virale alors qu'en parallèle, l'IL-10 affaiblit le système immunitaire et permet l'échappement du virus.

Au laboratoire et au cours de ma thèse nous nous sommes alors penché sur l'implication des TLR dans l'infection par le VIH. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés au rôle du TLR4 comme récepteur de la protéine Tat dans l'induction de cytokines (IL-10, IL-6, IL-8, IFN- γ et TNF- α) par les monocytes primaires.

C. 1 Les TLR dans l'infection par le VIH

C. 1-a Le polymorphisme des TLR associé à l'infection par le VIH

L'évolution de la maladie vers le stade SIDA est très variable en fonction des individus. Selon la vitesse de progression de la maladie, on distingue trois types d'individus: (i) les progresseurs lents (SP), chez qui le SIDA se développe entre 3 et 10 ans après la séroconversion, (ii) les individus non progresseurs à long terme (LTNP) ou contrôleurs élite, chez lesquels la virémie est faible voire indétectable pendant plus de 10 ans et où les individus ne sont pas affectés, et enfin (iii) les progresseurs rapide (RP), chez qui le SIDA se développe dans les 2-3 ans après l'infection (329). Cette différence dans l'évolution de la maladie, dépend d'une combinaison de facteurs viraux, humains et environnementaux. En effet, de nombreux gènes de l'hôte ont été décrits comme pouvant influencer la progression de la maladie vers le stade SIDA. Notamment, on retrouve de nombreux gènes polymorphes, c'est-à-dire qui présentent une modification minime d'une (ou plus rarement plusieurs) paires de bases par rapport à la séquence normale. Ces modifications géniques seraient à l'origine de la majorité des maladies génétiques et de diverses susceptibilités aux infections. De nombreux travaux ont décrits trois catégories de gènes dont le polymorphisme est lié à la sensibilité au développement de la maladie suite à l'infection par le VIH. On retrouve (i) des gènes codant pour les récepteurs de surface cellulaire ou des ligands de ces protéines (CCR5-Rantes, CCR2-SDF1), (ii) les gènes du CMH (HLA-B27, HLA-B57, HLA-Bw4, HLA-B35) et (iii) les gènes des cytokines (IL-10, TNF- α) et des récepteurs liés à l'activation ou la régulation des réponses immunes (KIR, MBL, TLR).

Les TLR jouent un rôle clef dans l'immunité innée. De façon générale, des travaux se sont penchés, chez l'homme, sur la conséquence des SNP de chaque TLR sur l'infection par le VIH. Les travaux majeurs sur le rôle des SNP des TLR2, 3, 4, 7, 8, 9 sur la virémie, la production de cytokines pro et anti-inflammatoires et leurs conséquences sur l'infection et la progression

de la maladie vers la phase SIDA sont résumés dans le tableau ci-dessous (tableau 4).

Tableau 4. Les polymorphismes des TLR dans l'infection par le VIH.

TLR	SNP	Effets	Conséquences	Réf
TLR2	Pro613His	virémie identique pour les 3 phases	Aucune	S. O Pine, AIDS, 2009 M. Leal, JADS, 2008
	Arg753Gln			
	C597T			
	T1350C			
TLR3	Leu412Phe			
TLR8 (peptide signal)	Ala1Gly	- diminution NF- κ B et IL-10 - diminution faible des CD4 - augmentation du TNF- α	Progression lente vers SIDA => Protection	D. Y Oh, JID, 2008
TLR9 (diminution expression)	1635A/G G/G (sans HAART)	- virémie basse - augmentation des CD4		S. O Pine, AIDS, 2009
	1635A/A (avec HAART)	- virémie forte - diminution des CD4		M. Leal, JADS, 2008
TLR4 (LRR)	Wt/ Asp299Gly 5% africains	- virémie forte - progression SIDA rapide - susceptibilité à la tuberculose	Progression rapide vers SIDA => Exacerbation	Fewerda, AIDS, 2007 Fewerda, PNAS, 2007 S. O Pine, AIDS, 2009 M. Leal, JADS, 2008
	Asp299Gly/ Thr399Ile 5% Européens			
TLR7	Gln11Leu	- diminution IFN - diminution des CD4		D. Y Oh, JID, 2008

Bien que le VIH puisse activer les TLR3, TLR7, TLR8, les SNP sur chacun de ces TLR ne présentent pas les mêmes conséquences sur l'infection par le VIH et la progression de la maladie (tableau 4). Alors que les SNP des TLR2 et TLR3 ne semblent pas avoir de conséquences sur la virémie et l'infection au VIH, les individus présentant des SNP sur les TLR8 et TLR9 semblent être protégés et/ou progressent moins rapidement vers la phase SIDA. En effet, la mutation Ala1Gly touchant le peptide signal du TLR8 a pour conséquence de diminuer la production d'IL-10 NF- κ B dépendante, d'augmenter la synthèse de TNF- α , d'inhiber la perte des T CD4 et ainsi de protéger les individus porteurs de cette mutation

contre l'infection par le VIH. Les études réalisées sur les SNP du TLR9 semblent assez controversés. En effet, les cohortes présentant un SNP 1635A/G ou G/G progressent beaucoup moins rapidement vers le stade SIDA. Ces données ont été obtenues chez des cohortes généralement sans traitement antirétroviral. Au contraire, les individus sous traitements antirétroviraux, HAART, présentant un polymorphisme 1635A/A, 1635A/G et 1174 G/A progressent beaucoup plus rapidement vers la phase SIDA (330). C'est aussi le cas des individus ayant un polymorphisme Gln11-Leu sur le TLR7. De façon intéressante, des mutations dans le gène codant la partie « Leucine Rich Repeats » du TLR4 ont été associées à une susceptibilité beaucoup plus accrue à l'infection par le VIH et à l'évolution de la maladie vers le stade SIDA. En effet, les mutations Asp299Gly et Thr399Ile sont associées à une forte virémie, une progression beaucoup plus rapide de la phase SIDA et une augmentation de la susceptibilité aux tuberculoses.

Toutes ces données tendent ainsi à suggérer une implication forte des TLR dans la susceptibilité à l'infection par le VIH et surtout un rôle primordial dans l'évolution de la maladie vers le stade SIDA.

C. 1-b La reconnaissance du VIH par les TLR

Etant donnée le rôle des TLR dans la reconnaissance des pathogènes et des génomes viraux, de nombreuses études se sont penchées sur la capacité des TLR intracellulaires à reconnaître le VIH-1. En 2010, une étude de microarray réalisée par l'équipe de Clerici a montré clairement le rôle des TLR dans l'immunité anti-VIH (285). Dans cette étude, les auteurs révèlent qu'une cohorte composée d'individus italiens exposés séronégatifs (ESN) présentent une plus forte activation des PBMC en réponse aux ligands TLR3, TLR4 et TLR7/8. Ces individus présentent aussi une augmentation de l'expression des adaptateurs des TLR et des cytokines et une diminution de l'expression des régulateurs négatifs des voies TLR (331). Cette étude émet alors l'hypothèse que les ESN ne sont pas infectés par le VIH-1 et sont protégés de l'infection comparativement aux individus contrôles de part leurs capacités à répondre extrêmement bien à l'infection par la forte activation des TLR3, TLR4 et TLR7 et TLR8. Ainsi plusieurs études ont montré et confirmé la capacité des TLR3, TLR7/9 à reconnaître le VIH et induire une réponse immune. En effet, l'équipe de Meier a ainsi montré la capacité des d'ARN simples brins du VIH riches en uridines contenus dans les séquences Gag, Pol, Vif, Vpr, gp160 à être reconnus par les monocytes et les pDC. Cette équipe a montré que l'ARN40 simple brin du VIH peut être reconnu par le TLR7 des monocytes et des pDC et induire leurs activations et maturations. Plus précisément, l'équipe

de Meier et celle de Alter ont démontré que l'activation de ces CPA par la liaison ARN du VIH-TLR7 active une immunité anti-VIH *in vitro*. Notamment, ces études révèlent la capacité des CPA activées par l'ARN40 du VIH à activer les NK et les CD8 et ainsi inhiber la réplication du virus dans les cellules infectées. De manière similaire, d'autres études ont montré la capacité du TLR3 des DC myéloïdes à reconnaître l'ARN double brin produit au cours de la réplication du VIH (54, 55, 57, 332, 333). Cette activation des mDC par l'ARN bicaténaire du VIH conduit à l'activation et la maturation des DC qui a pour conséquence l'activation des T CD8. Ces T CD8 activés peuvent alors, *in vitro*, détruire les cellules infectées par leurs activités cytotoxiques.

Ces études ont été réalisées *in vitro*, or on sait que le VIH, *in vivo*, échappe au système immunitaire, persiste dans l'organisme et conduit à la progression de la maladie vers le stade SIDA. On peut alors se demander comment le VIH, bien que reconnu par les TLR, échappe au système immunitaire ? Une étude récente, *in vivo*, a montré chez la souris qu'une stimulation chronique du TLR7 murin par l'ARN40 du VIH conduit à un phénotype type « SIDA Like ». En effet, il apparaît chez ces souris chroniquement stimulées, une forte production d'IFN- γ et d'IL-10 associée à une anergie des L_T , une lymphopénie et une diminution de la taille des ganglions similaires à ceux retrouvés chez les patients infectés par le VIH en phase SIDA (334, 335). L'engagement répété des TLR au niveau des lymphocytes T serait donc responsable de l'immunosuppression. On peut alors penser qu'*in vitro* et/ou au stade précoce de la primo-infection, le VIH est reconnu par les TLR3, TLR7/9 des CPA et une immunité anti-VIH est mise en place. Cependant, la stimulation chronique de ces TLR par le VIH peut contribuer à la perturbation de l'homéostasie des réponses immunes. A la lumière de ces connaissances, on peut penser que la stimulation chronique du système immunitaire par les TLR3, TLR7/9 contribue à l'affaiblissement et la dérégulation du système immunitaire qui conduit à l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. Cette activation chronique serait alors un mécanisme supplémentaire mis en place par le VIH afin d'échapper au système immunitaire et persister dans l'organisme.

C. 1-c Le détournement des TLR au profit du VIH

Bien que le VIH-1 puisse activer les TLR3, 7 et 8, de nombreuses études menées jusqu'à maintenant se sont intéressées au niveau d'expression des TLR au cours de l'infection mais aussi à l'impact de la stimulation des TLR sur l'infection et notamment sur la réplication du VIH (tableau 5). Ainsi, il a clairement été établi dans de nombreux types cellulaires une augmentation de l'expression des TLR2, TLR2/6, TLR4, TLR7 et TLR9 au cours

de l'infection par le VIH. Ces expressions sont d'autant plus importantes que corrélées positivement avec une augmentation de la réplication du VIH et de la virémie. En effet, il a été démontré la capacité du VIH, indirectement par les cytokines et les co-infections ou directement par le virus lui même, à activer les TLR et par la même réactiver le réservoir latent, la réplication virale et favoriser la dissémination du VIH (tableau 5).

Tableau 5. Expression des TLR au cours de l'infection par le VIH.

TLR	Virémie	Mécanismes	Expression	Conséquences	Réf
TLR2 TLR2/6	+	NFAT, NF-κB, AP-1, CREB, Sp1 TNF-α	Augmentée (via gp120)	=> Activation chronique du système immunitaire	M. Tremblay, <i>Retrovirol.</i> , 2009 J.B Sundstrom, <i>Jl</i> , 2004 S.S Froland, <i>AIDS</i> , 2004 T.B Geitjensbeek, <i>JCI</i> , 2008
TLR4	+	NF-κB TNF-α	Augmentée	=> Réplication virale	J.B Sundstrom, <i>Jl</i> , 2004 M. Tremblay, <i>Retrovirol.</i> , 2009 D.C Douek, <i>Nature</i> , 2006 Y. Sun, <i>AIDS</i> , 2009
TLR5	+		Identique	=> Dissémination du virus	M. Tremblay, <i>Virology.</i> , 2009 M. Tremblay, <i>Retrovirol.</i> , 2009
TLR7	+		Augmentée		Y. Sun, <i>AIDS</i> , 2009 R.F Speck, <i>Blood</i> , 2009 M. Altfed, <i>Blood</i> , 2009
TLR9	+		Augmentée		J.B Sundstrom, <i>Jl</i> , 2004 Y. Sun, <i>AIDS</i> , 2009

- Détournement indirect des TLR par le VIH : implication des co-infections et des cytokines

L'activation indirecte des TLR par les produits microbiens, transloqués au niveau systémique au cours de l'infection ou par les pathogènes présents lors de co-infections avec le VIH, sont responsables de la réactivation, la réplication et la dissémination du VIH. En effet, les TLR activés de cette manière activent les facteurs de transcriptions tels que NF-AT, NF-κB, CREB, Sp-1 et la sécrétion de TNF-α responsable de l'activation chronique du système immunitaire mais aussi de la réactivation/réplication et dissémination du VIH.

Les TLR les plus étudiés chez les T CD4 sont les TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR8. Malgré l'expression du TLR4, aucune équipe n'est parvenue jusqu'à présent à détecter des effets suite à la stimulation de celui-ci. L'absence de réponse peut s'expliquer par l'absence de

certaines molécules accessoires comme le CD14. Toutes les études ont démontré que la stimulation des TLR2, TLR5, TLR7 et TLR8 mènent à l'activation et la maturation des cellules. En effet, dans le cas d'une stimulation *via* les TLR2 et TLR5, il a été remarqué que les T CD4 sécrètent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et de l'IL-8 qui permet de recruter et d'activer les cellules mais aussi la prolifération des T CD4 et ainsi participer à la dissémination et à la réactivation du virus latent. Les études menées sur les différentes sous-populations de T CD4 ont permis de constater que les effets de la stimulation des TLR sont toujours plus prononcés chez les cellules mémoires CD45RO, que chez les cellules naïves CD45RA. De plus, les études basées sur la stimulation des TLR7 et TLR8 ont permis de mettre en évidence que cette stimulation permet de réactiver le VIH latent au sein de lignées cellulaires. Enfin, une étude plus récente menée à la fois sur des T CD4 et des T CD8 a permis de mettre en évidence que les T CD8 et T CD4 étaient aussi activés par les TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9. Suite à ces stimulations, les T CD4 entrent plus rapidement en apoptose, ce qui favorise la dissémination du VIH au travers l'organisme. Cette étude met en avant le fait que les produits bactériens présents dans la circulation sanguine, suite à la translocation microbienne ou suite à des co-infections, contribuent à l'hyperactivation et la mort des cellules T et donc à l'évolution de la maladie.

- Détournement des TLR directement par les protéines virales

En plus de la réactivation du virus de façon indirecte par les cytokines et/ou les co-infections, le VIH-1 peut aussi détourner les TLR directement pour faciliter sa réplication (figure 28). En effet, il a été montré que le VIH requiert la signalisation du TLR8 et de DC-SIGN afin de se répliquer dans les DC (38). Plus précisément, le VIH-1 active le facteur de transcription NF- κ B par le biais du TLR8 ce qui permet d'initier la transcription du provirus intégré, par l'ARN pol II. Toutefois, la signalisation DC-SIGN est nécessaire pour l'élongation tardive de la transcription. Effectivement, cette étude montre que c'est la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 à DC-SIGN qui active la kinase Raf-1-responsable de la phosphorylation de la Ser276 de la sous-unité p65 de NF- κ B. Cette phosphorylation est essentielle car elle permet de recruter le facteur P-TEFb nécessaire à l'élongation de la transcription. Cette élongation de la transcription étant dépendante de P-TEFb et de la phosphorylation de l'ARNpol II, ces 2 interactions ARN-TLR8/ gp120-DC-SIGN sont primordiales à la réplication du VIH dans les DC (figure 28).

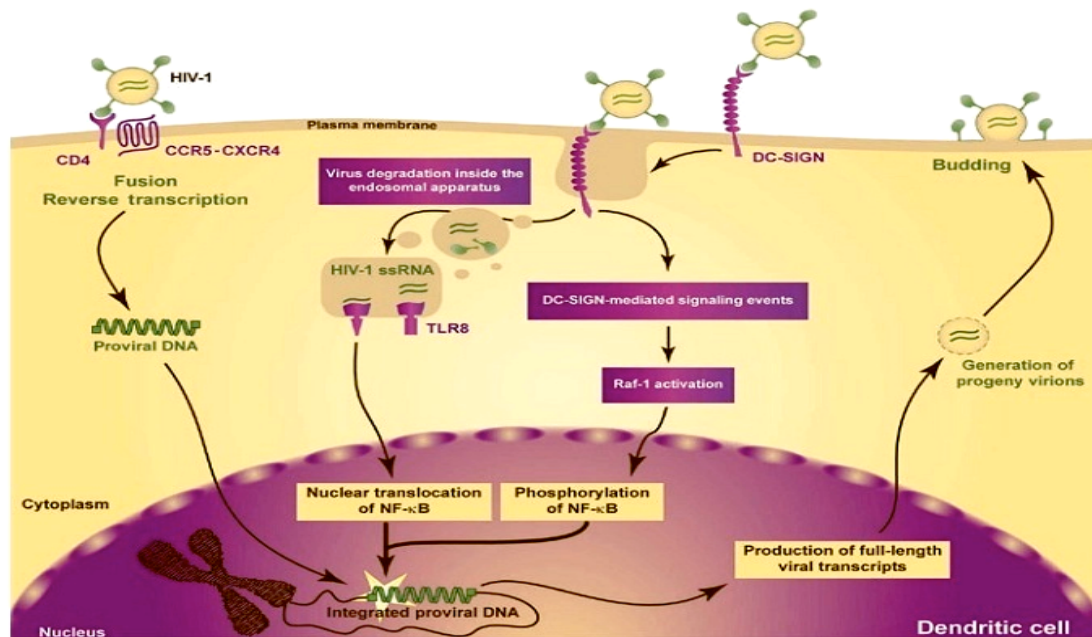


Figure 28. Infection productive des DC suite aux signaux induits par l'interaction du VIH avec le TLR8 et le récepteur aux lectines, DC-SIGN (38). Le VIH-1 est capable d'infecter directement les DC (à gauche) après l'entrée du virus par fusion des membranes cellulaires et virales. Les virions peuvent s'attacher à la surface des DC *via* DC-SIGN. Ce processus conduit à l'endocytose du VIH-1 dans les endosomes (au centre). Cet événement est suivi d'une dégradation rapide (dans les 24 h) de la majorité des virus entrants. L'ARN simple brin du VIH est alors libéré dans les endosomes et s'associe avec le TLR8 résidant. L'association TLR8-ARNsb aboutit à l'activation du facteur de transcription NF-κB, essentielle à l'initiation de la transcription. Cependant, ce processus n'est pas suffisant à l'élongation de la transcription. En parallèle, l'interaction gp120-DC-SIGN induit l'activation de Raf-1- qui phosphoryle la sous-unité p65 de NF-κB, permettant l'élongation de la transcription. Ces 2 voies activées promeut la transcription et la production de transcrits viraux complets de l'ADN proviral.

Ainsi, avec cette introduction il apparaît que le VIH, tout comme d'autres virus, a mis en place de nombreuses stratégies lui permettant à la fois de détourner l'activation du système immunitaire à son profit, d'inhiber sa reconnaissance par le système immunitaire et d'échapper à la surveillance et à l'élimination par l'organisme. Ainsi, la plupart des virus sont reconnus par les PRR mais ont développé la capacité de détourner l'activation des PRR, les TLR en particulier, à leurs profits. Comme nous avons pu le constater dans cette introduction, les virus utilisent les cytokines afin de se répliquer, de se disséminer et surtout afin de persister dans l'organisme. Ces cytokines, normalement produites suite à la reconnaissance des virus par les TLR afin d'activer le système immunitaire, sont dérégulées par les virus afin de favoriser l'infection et la pathogénèse des virus.

Etant donnée le rôle crucial des TLR dans l'évolution de l'infection par le VIH et le rôle clef de la protéine Tat dans la production d'IL-10 et de TNF-α, nous avons émis l'hypothèse d'un nouveau système d'échappement du VIH-1. En effet, nous avons étudié l'hypothèse du détournement du TLR4 des monocytes/macrophages par la protéine Tat, afin d'induire la

production d'IL-10 et de TNF- α . Ainsi, dans un premier article, nous avons étudié cette hypothèse à l'aide de plusieurs tests complémentaires. Plus précisément, nous avons montré que Tat par une interaction directe et forte avec le TLR4-MD2 et le MD2 sur les monocytes, active la sécrétion d'IL-10 et de TNF- α . De façon intéressante, nous avons remarqué que la production de ces cytokines nécessite la présence du CD14 et du MD2. De manière similaire, nous avons aussi montré que Tat dérégule la production d'autres cytokines, importantes dans l'évolution de la maladie vers la phase SIDA, par son interaction avec le TLR4-MD2 telles que l'IL-6, l'IL-8 et l'IFN- γ . Ces résultats confirment le rôle primordial de la protéine Tat dans la dérégulation du réseau de cytokines.

Après avoir montré que Tat active et détourne le complexe TLR4-CD14-MD2 pour produire l'IL-10 et le TNF- α , nous nous sommes intéressés à la transduction des signaux induits suite à cette interaction. Ainsi, nous avons pu montrer que Tat active les signalisations dépendantes de Myd88 et de TRIF du TLR4, afin d'activer les voies MAPkinases, NF- κ B et PKC responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IFN- γ et TNF- α) et immunosuppressives (IL-10). Par ces cytokines, Tat, très précocement au cours de l'infection, participerait activement à l'hyperactivation du système immunitaire et à son affaiblissement. Ainsi, le détournement du TLR4 par Tat dans la production de cytokines pourrait être à l'origine des désordres immunitaire et nerveux observés tout au long de l'infection et donc à l'évolution de la maladie vers la phase SIDA.

RESULTATS

Article 1.

HIV-1 Tat protein interaction with TLR4-MD2 receptor complex is required for cytokine production

Ben Haij N.*, Leghmari K.*, Planès R.*, Bahraoui E.*\$

* Unité mixte INSERM/CNRS/UPS 1043, équipe 8: Infections virales persistantes, réponses de l'hôte et physiopathologie - CPTP BP3028 31024 Toulouse cedex 3 - France

\$ Corresponding author bahraoui@cict.fr

Résumé

La protéine Tat joue un rôle crucial dans la dérégulation du réseau de cytokines au cours de l'infection par le VIH-1. Au laboratoire il a été montré que Tat agit à la membrane des monocytes pour induire la production d'IL-10 et de TNF- α , des cytokines essentielles à l'évolution de la maladie vers la phase SIDA et le développement de la démence.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en place par la protéine Tat du VIH-1 pour déréguler le réseau de cytokines, nous avons évalué l'implication du TLR4 comme récepteur de la protéine Tat sur les monocytes/macrophages. Dans cette étude, nous avons montré que Tat, par son domaine 1-45, interagit avec une forte affinité ($K_{0.5}$ entre 4.10^{-9} et 10^{-9} M) avec le complexe TLR4-MD2 et la protéine MD2, mais pas avec la protéine CD14. Cette interaction est nécessaire à la production d'IL-10 et de TNF- α . En effet, l'utilisation d'anticorps bloquants le TLR4 ou de macrophages murins KO pour le TLR4 inhibe totalement la synthèse de cytokines induite par Tat. De façon similaire, nous avons aussi montré l'implication des cofacteurs du TLR4, CD14 et MD2, dans la synthèse de cytokines induite par Tat. Enfin, nos résultats montrent que Tat, suite à son interaction et l'activation du TLR4-MD2, régule négativement l'expression du TLR4 mais aussi induit l'expression de SOCS1 et SOCS3, deux régulateurs négatifs des voies de signalisations.

L'ensemble de ces résultats indiquent pour la première fois le détournement du TLR4 par la protéine Tat du VIH-1 pour l'induction de l'IL-10 et du TNF- α , deux cytokines essentielles à la réplication et à la persistance du VIH-1.

HIV-1 Tat protein interaction with TLR4-MD2 receptor complex is required for cytokine production.

Ben Haij N.*, Leghmari K.*, Planès R.*, Bahraoui E.*\$

* Unité mixte INSERM/CNRS/UPS 1043, équipe 8: Infections virales persistantes, réponses de l'hôte et physiopathologie - CPTP BP3028 31024 Toulouse cedex 3 - France

\$ Corresponding author bahraoui@cict.fr

Keywords: HIV-1, TLR, Tat, IL-10, TNF- α

Abstract

Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection results in hyper-immune activation and immunological disorders as early as the asymptomatic stage. Defining the viral factors involved in this abnormal immune activation and immune dysregulation is crucial to understanding the immunophysiopathology of HIV-1 infection and AIDS progression. We hypothesized that during early HIV-1 infection, HIV-1 Tat protein, secreted by infected cells, acts on monocytes/macrophages to induce IL-10 and TNF- α production and participates in this immune system dysregulation.

In this work, we showed that N-Terminal domain 1-45 of Tat is necessary for the production of both proinflammatory (TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines. In addition, our data demonstrated that i) Tat protein induces the production of both TNF- α and IL-10 by acting at the monocyte/macrophage membrane level, ii) Tat protein interacts specifically with TLR4-MD2 and MD2 with high affinity at nM level ($K_{0.5}$ between 4.10^{-9} to 10^{-9} M) but not with CD14, iii) cytokines production induced by Tat was abrogated following blockade anti-TLR4 mAb, iv) stimulation of monocytes/macrophages by Tat protein results in down-regulation of TLR4 and in up-regulation of SOCS1 and SOCS3 proteins, v) incubation of macrophages from either TLR4 KO, MD2 KO or CD14 KO mice failed to produce TNF- α and IL-10 by monocytes/macrophages.

Collectively, our results suggest for the first time that, during primo-infection, HIV-1 Tat, by its N-terminal domain, interacts with TLR4-MD2 on monocytes/macrophages. This interaction promotes proinflammatory cytokines (e.g. TNF- α) and immunosuppressive factors (e.g. IL-10, SOCS1 and SOCS3), both involved in immune dysregulation during early

infection by HIV-1 and AIDS progression. This study may contribute to understand the mechanisms put in place by HIV to induce immunosuppression but also to identify new therapeutic targets for future treatments.

Introduction

Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection is characterized by multiple and complex types of interactions between the virus and the host. Starting from the acute phase, HIV-1 infection leads to a peak of virus replication, followed by a severe and rapid depletion of CD4 T-cells in lymphoid tissues, especially in the gastrointestinal tract (1-4). A dramatic depletion of mucosal CD4 T-cells has been demonstrated in SIV macaque model and then confirmed in HIV-1 infected human patients (1, 3, 4). In consequence, bacterial products translocate from the intestinal lumen into the plasma (5, 6).

HIV-1 infects numerous cells of the immune system, essentially CD4 T-cells, monocytes/macrophages and, to a lesser extent, dendritic cells (7, 8). These cells are known to play key roles in both innate and adaptive immune responses. Interactions between HIV-1 and the immune system lead to immune activation from the acute phase. This immune activation, which persists during the chronic state, is associated with gradual depletion of circulating CD4 T-cells, a high set point of viral replication that persists despite antiviral immune response, exhaustion of T cells, polyclonal B-cells activation, increased frequencies of activated T-cells, an increase in T cell turnover, a decrease in plasmacytoid dendritic cells (pDC) and myeloid cells (mDC), and production of proinflammatory cytokines and chemokines. These hyperstimulation inevitably lead to the weakening of the immune system that facilitates HIV-1 replication, virus persistence and AIDS disease progression (5, 9-13).

These abnormal immune activations are likely to be multifactorial and are thought to be mediated largely by proteic and nucleic viral factors, in addition to bacterial products translocated from the intestinal lumen into the plasma following recruitment of a variety of host cell receptors, especially those implicated in the regulation of innate and adaptive immune responses. Therefore, exploring the interplay between viral compounds and the pathways which are involved in this abnormal activation of host cells, seems to be critical to the understanding of HIV-1-induced immunopathogenesis. This interplay targets both adaptive and innate immune cell receptors. For example, the glycoprotein envelope of HIV-1,

gp120, activates a variety of signaling pathways, including MAPkinases, NF- κ B, G-proteins and calcium following its interaction with CD4 (14-21), CXCR4/CCR5 (17, 22, 23), DC-SIGN (24). In addition to the structural proteins, regulatory proteins have also been reported to interfere with innate and adaptive immune responses. HIV-1 Nef protein, by inhibiting ASK-1 activity or by down modulating surface MHC-I expression, helps to inhibit the apoptosis of HIV-1 infected cells or their killing by specific CD8 CTL (25-30). This accessory protein seems to play crucial role in HIV-1 infectivity and in viral pathogenesis. It has been shown that persons infected with an HIV-1 strain that contains a large deletion in the nef gene, lose the ability to progress to AIDS at least during the first ten years after the primo-infection (12, 31). In agreement with this observation, similar results have been reported in the SIV adult macaque model infected with a SIV delta nef strain (32). More interestingly, such infected macaques became protected following challenge with a pathogenic SIV strain (33). In addition to the pathogenic effect of Nef, more recently it has been shown that SIV VpX, a gene product encoded only by the SIV and HIV-2 genome, interferes with innate immunity by blocking the HIV-1 restriction factor, SAMHD1 (34). One hypothesis suggests an association between VpX expression and the capacity of the immune system to better control lentiviral immunopathogenesis (34-36). Such an hypothesis is in line with non-pathogenic SIV infection in its natural hosts, the sooty mangabeys and African green monkeys, two adapted natural SIV hosts.

HIV-1 is also able to activate cells of the innate immune system. By its genomic RNA, HIV-1 activates TLR7/8 to induce proinflammatory cytokines, including TNF- α and IFN-I that contribute to immune activation and viral replication (37, 38). Toll-like receptors, expressed in or on various cell types including the cells of the immune system, play an essential role in the initiation of the innate and adaptive immune responses. Like TLR, other innate immune receptors including NOD-like receptors (NLR), RIG-like receptors (RLR) and C-type lectin receptors (CLR), recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMP) to activate proinflammatory cytokines and chemokines (39). At least 10 TLR families have been reported in humans and 13 in mice (39, 40). Our group (41-48) and others (49-52) have shown that HIV-1 Tat protein is able to stimulate proinflammatory (IL1- β , IL-6, IFN- γ , TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in human monocytes/macrophages. Considering the fact that Tat is an early gene product, one can assume that its proinflammatory effect may initiate the establishment of an early immune activation state from the first days post-infection, before the alteration of the gut intestinal mucosal barrier and microbial translocation.

Tat protein is an 86 to 101 amino-acid polypeptide of 14 kDa, known for its crucial transactivation activity of HIV-LTR (53). Tat protein is structured in several domains including the N-terminal region 1-47, which contains the activation domain, and the basic region 48-60, which is essential for Tat internalization, nuclear localization and RNA binding at the LTR-TAR region (54). In the absence of Tat, the viral transcription is blocked at the elongation step. Tat protein is found at nM levels in the serum of HIV-1 infected patients (55, 56). However, it can reasonably be assumed that this quantification is underestimated, due to the proportion of Tat protein already adsorbed on the surface of cell membrane via heparan sulfates (57, 58) and to the fact that this concentration could be much larger near the lymphoid organs and in the vicinity of infected cells.

Beside its crucial role in activating viral replication, Tat also participates in the pathogenesis of HIV-1 infection by its capacity to interact with different cell types. It is secreted by infected cells (56) and can act on other cells whether they are infected or not (59-61). In addition to its direct role in viral transcription, Tat contributes to the spread of HIV-1 through its effect on the increase of CCR5 and CXCR4 surface expression (62) and on the activation of quiescent CD4 T-cells which are used by the virus as new target to enhance HIV-1 replication (63). Tat has been found to induce neurotoxicity in the central nervous system (64-66) and apoptosis in CD4 T-cells (67). Paradoxically, Tat has also been shown to mediate macrophage survival by upregulating Bcl2 expression (68). Tat is also known to inhibit MHC-I cell surface expression (62), IL-12 production (69) and MnSOD activity (70). While some of these effects are mediated after intracellular uptake of Tat, others are mediated by the interaction of extracellular Tat with cellular receptors. Different domains of Tat have been implicated in interactions with membrane receptors: the N-terminal region with CD26 receptor (71) and L-Type calcium channel (45), the tripeptide RGD with integrin $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ of dendritic cells (72), and the basic domain with membrane lipids (64) or with the Flk-1/KDR receptor (73). Among these potential Tat receptors, it would be of importance to determine which receptor(s) participate to the activation of signaling pathways that lead to the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, reported by our group (41-48) and others (49-52), which seem to be strongly involved in the abnormal immune activation and immune deficiency.

To this end, we advance TLR4 as a potential candidate receptor for Tat protein for the following reasons: i) Tat protein induces the production of TNF- α and IL-10 by human monocytes/macrophages by acting at the cell membrane level, ii) TLR4 is expressed on the

surface of monocytes/macrophages, iii) the signaling pathways activated by Tat, including MAPkinases (42, 47), PKC (41, 43-45, 74) and NF- κ B (46), are also activated following the engagement of the TLR4 pathways (75), iv) the domain of Tat involved in the induction of TNF- α and IL-10, being located in the first amino acids, has more than 67% homology with the fusion peptide of the MMTV envelope protein, also known to induce IL-10 production through interaction with TLR4 receptor. Since, understanding the mechanism by which HIV, by its Tat protein, hijack the TLR4-CD14-MD2 receptor complex to induce cytokine production by monocytes/macrophages, represents a crucial interest for the establishment of new therapeutic strategies for future treatments.

MATERIAL AND METHODS

Cells cultures.

Monocyte isolation. PBMCs were isolated from buffy coat of healthy HIV-1-negative donors by Ficoll density gradient. Briefly, PBMC were counted and resuspended in a 60/30 complete medium (60% AIMV, 30% Iscove; (Gibco)) containing 1% foetal calf serum (FCS), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/ml). Monocytes were separated from lymphocytes by adherence to tissue culture plastic (Beckton Dickinson). After an incubation of 1 h at 37°C 5% CO₂, non-adherent cells were removed and adherent cells (> 94% CD14⁺ by flow cytometric analysis) were washed and cultured in 60/30 complete medium containing 10% FCS, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml) before being used in the experiments.

Human embryonic kidney 293 cell line. HEK293T YFP-TLR4 and YFP-TLR4-MD2 were obtained from Dr. Alberto Visintin (National Institute of Health, Bethesda). Cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FCS, penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL) and G418 (100 µg/ml), at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Transfected HEK cell line stably expressing TLR4, TLR4-CD14-MD2, TLR2-CD14 and non-transfected HEK cell line (HEK Null) were purchased from Invivogen. HEK Null and HEK-TLR4 cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, normocin (100 µg/mL) and blasticidin (10 µg/ml); while HEK TLR4-CD14-MD2 and HEK TLR2-CD14 cell lines were grown in DMEM 10% FCS, normocin (100 µg/ml), blasticidin (10 µg/ml) and hygromycin (50 µg/ml) at 37°C and 5% CO₂.

Human monocytic leukemia cell lines. THP-1 and U937 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). They were grown in RPMI1640 supplemented with 10% FCS, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml) and maintained in a 37°C humidified atmosphere with 5% CO₂.

Primary mouse peritoneal macrophages.

C57BL/6 Wt were purchased from Charles Rivers. C3H/HeN (Wt) and C3H/HeJ (deficient for the TIR domain of TLR4) or Knockout (KO) mice C57BL/6: TLR4^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR3^{-/-}, TLR9^{-/-}, CD14^{-/-}, MD2^{-/-} were a generous gift from Dr. B. Ryffel (laboratory of molecular immunology and embryology, CNRS, Orléans, France). Primary macrophages were isolated as previously described (76). Briefly, mice were injected intra peritoneally with 1 ml of

thioglycolate medium 3% (Biomerieux). Three days later, the mice were sacrificed and macrophages were recovered by peritoneal washes and then enriched by adherence selection for 1 h in complete medium (DMEM supplemented with or without 2% FCS, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Isolated macrophages were characterized by FACS analysis for the expression of CD11b⁺.

Tat protein and TLR ligands.

Recombinant HIV-1 Tat protein1-86 was obtained from “Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA” (Paris, France). Synthetic Tat was obtained from Dr. M. Benkirane (CNRS UPR 1142 Montpellier). Recombinant GST and deleted Tat mutant proteins were produced in our laboratory. Each protein was produced and purified as previously described (41). The level of endotoxin contamination was assessed using the Limulus amoebocyte lysate assay (Bio-Septra, Villeneuve la Garenne, France). All these recombinant proteins contained less than 0.3 EU/µg LPS, the limit of detection of this test. Lipopolysaccharide (LPS) (TLR4) from *E. coli*, serotype R515, was purchased from Alexis biochemicals. Pam3CsK4 (TLR2/1), Imiquimod R837 (TLR7) and poly:I-C (TLR3) were obtained from InvivoGen (San Diego, CA). For control stimulation, phorbol 12 myristate-13-acetate (PMA), a PKC activator, was purchased from Calbiochem. Mouse recombinant human IFN-γ was purchased from eBioscience.

Antibodies and chemical inhibitors. For inhibition experiments: monoclonal antibodies against human antigens: anti-TLR4 (clone HTA125), anti-TLR2 (clone TL2.1), anti-CD14 (clone 61D3) and mouse IgG2a isotype were obtained from eBioscience. Anti-CD14 (clone RMO52 and clone MY4) and mouse IgG isotype controls were from Beckman Coulter; anti-MD2 (clone 288307) was purchased from R&D Systems. Monoclonal anti-Tat antibodies were obtained from ANRS (Paris). The 26S proteasome inhibitor MG132 was from Calbiochem. The raft disrupting drug methyl-β-cyclodextrine (M-βCD) and a GTPase dynamin inhibitor dynasore were from Sigma.

For confocal imaging and flow cytometry analysis: goat anti-human TLR4 was from R&D System. Unlabelled mouse anti-TLR4 and labelled mouse anti-TLR4-PE were from eBioscience. Mouse isotype control IgG2a-PE was from eBioscience. FITC coupled secondary antibodies produced against mouse immunoglobulins were obtained from DAKO. Rabbit polyclonal anti-GST and anti-Tat antibodies were produced in our laboratory. Alexa 488 or 555 labelled IgG against rabbit and goat IgG respectively, were from Invitrogen. Nuclear markers chromomycinA3, dapi and membran marker WGA were from Sigma.

For western blot analysis, recombinant human MD2, rhCD14 and rhTLR4-MD2, monoclonal anti-human MD2 and anti-TLR4 were from R&D systems. Monoclonal anti-human CD14 (MEM-18) was from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit polyclonal anti-human SOCS1 and SOCS3 were purchased from Abcam.

Methyl- β -cyclodextrin and dynasore treatments.

Cells were plated for ELISA assay in 24-well plates. After 24 h, cells were pre-incubated for 10 or 60 minutes with various concentrations of M- β CD, a raft-disrupting drug, or for 30 min with various concentrations of dynasore for dynamin inhibition. As a control, cells were treated with similar amounts of dimethyl sulfoxide (DMSO) to those used to solubilize the inhibitors. After drug pretreatment, cells were incubated with Tat proteins (100 nM). As positive and negative controls, cells were stimulated with LPS or GST respectively. After 24h, culture supernatants were tested by ELISA. Any possible cytotoxic effect of the inhibitors was tested by the trypan blue dye exclusion assay. No related cytotoxicity was observed and cell viability was > 95% at the concentrations used.

Cytokine detection by ELISA.

Adherent monocytes (106/well), murine macrophages (5.105/well) or HEK cells (5.105/well) were washed 3 times with cold PBS. Cells were then cultured in the presence of 1% FCS. After 24 h of cell treatment, the supernatants were collected and analyzed for human and mouse TNF- α and IL-10. Cytokine amounts were determined using ELISA kits from BD Biosciences and R&D Systems according to the manufacturers' instructions.

Confocal microscopy.

HEK cells were grown on 12-mm round coverslips at 60-80 % confluence. They were then incubated with GST-Tat (100 nM) for 15 min. After stimulation and washing with PBS, cells were fixed with 4% paraformaldehyde-PBS for 10 min. After 3 washes, they were incubated with 50 mM of NH₄Cl for quenching. This step saturated free aldehydes to inhibit auto-fluorescence. After extensive washing, the cells were saturated with PBS-BSA 5% for 30 min. For colocalization experiments, GST-Tat and TLR4 proteins were labelled for 45 min at room temperature with 10 μ g/ml of mouse (Mab anti-Tat) or goat primary polyclonal anti TLR4 antibodies. After washes, Tat and TLR4 antibodies were labelled with the corresponding secondary antibodies: Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-555-conjugated antibodies directed against mouse or goat immunoglobulin G (1/500) for 45 min at room temperature. After three

washes with PBS or PBS-MgCl₂ 150 mM, cell nuclei were stained at room temperature with DAPI or chromomycin A3 in PBS-MgCl₂ 150 mM for 1h. The images were taken with a confocal microscope (Zeiss Axiomager LSM 710 META scanning unit and a 1.4NA x 63 objective). Colocalization and subcellular localization were analyzed and processed with ImageJ. Colocalization images were measured and quantified with JacoP software.

GST pull-down and Co-immunoprecipitation assays.

For GST pull-down, equal amounts of GST, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST-Tat 1-101 proteins coupled to glutathione agarose beads were saturated with BSA (250 µg/ml) for 2 h at 4°C. After washing (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM), agarose fixed proteins were incubated with 1 µg of TLR4-MD2, MD2 or CD14 soluble recombinant human proteins (R&D Systems) or total cellular extracts (500 µg) either from HEK 293T or HEK 293T-TLR4 cells or from primary human monocytes. The beads were then washed extensively with Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0.5%, PMSF 0.5 mM, leupeptin 10 µg/mL, Na₃VO₄ 0.2 mM, NaF 0.05 mM and the presence of retained TLR4, MD2 or CD14 proteins was analyzed by SDS-PAGE and western blot using specific antibodies.

For the immunoprecipitation assay, primary monocytes (107/well) were incubated with GST, GST-Tat1-101 or deleted Tat mutants (1µM). After 20 minutes, cells were lysed with ripa buffer (Tris HCl 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, 0.5% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 10% SDS, DTT 1 mM, leupeptin 10 µg/mL, pepstatin 10 µg/mL) and clarified by centrifugation at 4°C for 10 min at 14 000g. Preformed Tat-TLR4 complexes were then immunoprecipitated by a mixture of anti-TLR4 antibodies (2 µg) and protein A sepharose. After overnight binding at 4°C, 2 µg of bridging antibody (polyclonal rabbit anti-mouse IgG, Dako) were added, and the mixture was incubated for an additional 24 h with shaking at 4°C. After three washes, the retained complexes were analyzed by SDS-PAGE 12% and western blot using specific antibodies as described above.

Binding and competition assays.

Recombinant human MD2, TLR4-MD2, TLR4 or CD14 (R&D systems) were coated at the indicated concentrations in 96 well plates (Nunc Rotschild) for 24h at 4°C. After washing with PBS-0.05% Tween20, wells were saturated with PBS-0.05% Tween20 5% non-fat milk for 1 h at 37°C. After 3 washes, various amounts of GST, GST-Tat 1-101 or Tat deleted mutants were incubated for 2 h at 37°C. For competition assays, GST-Tat or its deleted mutants previously incubated for 1 h at 37°C with different ligands were added to compete

with the coated proteins (MD2 or TLR4-MD2) in the wells for an additional 2 h. After extensive washing, binding was detected by anti-GST (1/500) or monoclonal anti-Tat antibodies (10 µg/ml) for 1 h. After washing, 100 µL of 1/1000 horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-rabbit or anti-mouse IgG (Dako) were added for 1 h at 37°C. After 7 washes of 2 min each, 100 µl of TMB substrate were added. The reaction was stopped by adding 50 µl of H₂SO₄ 2N. Absorbance was measured at 450 nm with a wavelength correction at 600 nm.

Flow cytometry.

Primary monocytes, U937 or HEK cells, pretreated or not for 30 min with dynasore (100 µM), were left unstimulated or stimulated with GST-Tat, GST or LPS in complete medium containing 10% FCS for the indicated time periods. Cells were then detached by cold PBS-EDTA 5 mM, washed with PBS-FCS 5%-Azide 0.01% and stained with anti-TLR4 (10 µg/ml), anti-TLR4-PE or isotype control IgG2a-PE for 45 min on ice. After 3 washes, cells were incubated with secondary rabbit anti-mouse FITC-IgG (Becton Dickinson) for 45 min on ice. After washes, cells were fixed with 1% PFA and analyzed by flow cytometry.

Analysis of SOCS1 and SOCS3 induction.

HEK cell lines, human monocytes or dendritic primary cells were seeded into 12-well plates at 106 cells per well in complete medium. The cells were then stimulated with the indicated amounts of GST-Tat, GST, LPS, IFN-γ or LPS+IFN-γ in the presence or not of blocking anti-Tat antibodies. After 24 h of stimulation, the cells were centrifuged and lysed with total lysis ripa buffer. Equal amounts of protein were subjected to 12% SDS-PAGE, transferred into nitrocellulose membrane and immunoblotted to detect SOCS1 and SOCS3 expression.

Statistical tests.

All statistical analyses used the Student's t-test, unpaired for normal distribution, for at least three independent experiments. Differences were considered significant at p values < 0.05. Microsoft Excel and Prism were used to construct the plots and measure means, standard deviations and p values.

RESULTS

Tat protein induces the production of TNF- α and IL-10 by acting at cell membrane level in human monocytes.

Our group (41-48) and others (49-52) have shown that HIV-1 Tat protein is able to stimulate the production of proinflammatory (TNF- α , IL1- β , IL-6, IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in human monocyte/macrophage cells. Tat protein contains a nuclear localization sequence between amino acids 47 and 57 which allows it to be taken up by cells into the nucleus. Thus, Tat protein could act at either the membrane and/or the nucleus level. Stimulation of human monocytes with total Tat protein or with GST-Tat 1-45 (with deletion in the C-terminal region), but not GST-Tat 30-72 or GST alone, activated the production of TNF- α and IL-10 by monocytes (Figure 1A). This result indicates that, despite the absence of the basic region 47-57 which is essential for the penetration of Tat, the N-terminal fragment Tat 1-45 was still able to stimulate the production of TNF- α and IL-10 in the same way as total Tat protein likely by acting at the cell membrane level of monocytes. This conclusion is in agreement with the ability of total Tat protein, which had previously been immobilized in wells, to induce the production of TNF- α and IL-10 (data not shown) and underscored the importance of the N-terminal region of Tat protein.

Stimulation of monocytes with a chemically synthesized Tat protein that had never been in contact with bacterial products induced the production of TNF- α and IL-10 in a dose dependent manner (Figure 1 B). Tat-induced cytokines (TNF- α and IL-10) production was greatly inhibited in the presence of monoclonal antibodies directed against the N-terminal domain 1-15 but not by monoclonal antibodies directed against the central region 48-60 or the C-terminal domain 74-86 of Tat protein (Figure 1C). Interestingly, the mixture of the 3 monoclonal antibodies completely abolished Tat-induced cytokine production (Figure 1C). Tat oxidation by H₂O₂, its trypsin digestion (1 hour at 37°C) or heating (5 min at 95°C) totally abolished the capacity of Tat to induce the production of TNF- α and IL-10, while such treatments had no effect on the capacity of LPS to stimulate the production of these cytokines (Figure 1D). Using the LAL assay, we showed that the Tat protein used in this work contained no endotoxins within the limit of detection of the test (less than 50 pg/ml). In addition, LPS at 50 pg/ml did not cause the production of TNF- α and IL-10 in our experiments (data not shown).

Altogether, our results show that Tat protein, by its N-terminal domain, stimulates the production of TNF- α and IL-10 by acting at the cell membrane surface.

Tat protein induces TLR4-dependent cytokine production in human monocytes.

To investigate the role of TLR4-MD2 as a potential receptor implicated in the production of TNF- α and IL-10 following Tat-TLR4 interaction, we evaluated the inhibitory effect of the anti-TLR4 blocking monoclonal antibody (Mab), clone HTA125, on Tat-induced cytokine production. To this end, primary human monocytes were pretreated with increasing amounts of anti-TLR4 (0.1–1 μ g/ml) before stimulation by Tat (100 nM). In these conditions anti-TLR4 antibodies inhibited Tat-induced cytokine in a dose dependent manner (Figure 2A-B). Total inhibition was obtained with anti-TLR4 Mab at 1 μ g/ml. Similarly, when monocytes were pretreated with saturating amount of anti-TLR4 antibodies (1 μ g/ml) and then stimulated with increasing concentrations of Tat 1-101 (1-100 nM) or its deleted mutants Tat 1-45 (100 nM), strong inhibition of TNF- α and IL-10 were observed (Figure 2 C-D). No inhibition was observed when Tat stimulation was performed in the presence of anti-TLR2 or with irrelevant IgG antibodies harbouring the same isotype as HTA125 Mab in control experiments (Figure 2A). As expected, we showed that HTA 125 Mab also totally inhibited LPS-induced cytokine production (supplementary data).

To further characterize the specificity of these inhibitions observed with anti-TLR4 antibodies, monocytes were stimulated by Tat in the following kinetic conditions. Monocytes were pretreated for 60 min with increasing amounts of anti-TLR4 antibodies (0.01 to 1 μ g/ml) before stimulation with 10 nM Tat protein. In this condition, a dose dependent inhibition of TNF- α and IL-10 production was observed (Figure 2E). As previously described, the highest inhibition was obtained with anti-TLR4 antibodies at 1 μ g/ml (Figure 2E). Interestingly, when similar concentrations of anti-TLR4 antibodies were added at the same time as Tat, a lesser degree of inhibition of TNF- α and IL-10 was observed with anti-TLR4 used at 0.1 and 1 μ g/ml (Figure 2E). In contrast, no inhibition of IL-10 was obtained with the smallest amount of anti-TLR4 antibodies (0.01 μ g/ml). In the third protocol, monocytes were previously stimulated with Tat 10 nM for 5 to 60 min before anti-TLR4 antibodies were added at 0.1 μ g or 1 μ g/ml. In these conditions, the results obtained showed that the sooner the anti-TLR4 was added, the greater was its inhibition effect on TNF- α and IL-10 (Figure 2E). Altogether, these results suggest that Tat and anti-TLR4 antibodies compete for the same cell membrane receptor and that Tat pretreatment for 30 to 60 min seems to be sufficient to trigger the activation of

signaling pathways leading to significant production of TNF- α and IL-10. This interpretation is in agreement with data obtained with monocytes firstly pre-incubated 60 minutes with 0.1 or 1 $\mu\text{g/ml}$ of anti-TLR4 antibodies, then washed twice or left unwashed, and stimulated with Tat 10 nM (Figure 2F). These data suggest a partial TLR4-anti-TLR4 dissociation following the two washes, at least at the smallest amount (0.1 $\mu\text{g/ml}$) of anti-TLR4 antibodies (Figure 2F), then Tat activation was allowed following Tat-TLR4 interaction. However, this phenomenon was less visible in the presence of an excess of anti-TLR4 antibodies (1 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 2E).

Altogether, the results indicate that Tat induce TLR4-dependent production of IL-10 and TNF- α in human monocytes.

HIV-1 Tat protein interacts with TLR4-MD2

Taking these data into consideration, we investigated the capacity of Tat to interact with TLR4 and its cofactors MD2 and CD14. MD2 is a soluble glycosylated polypeptide of 160 amino acids which associates with high affinity to the ectodomain of TLR4, while CD14 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane glycoprotein of 375 amino-acids which seems to play an important role in the trafficking of TLR4 and other receptors, including TLR3, TLR7 and TLR9 (77).

To investigate whether Tat was able to interact with TLR4-MD2 complex, MD2 or CD14 soluble recombinant proteins were tested for their capacities to interact, in a solid phase assay, with HIV-1 Tat protein or its deleted mutants Tat 1-45 and Tat 30-72. The results depicted in Figure 3A show a direct interaction of Tat with TLR4-MD2 or with MD2 alone. In contrast, no interaction was observed between Tat and CD14 (Figure 3A). When GST was used as the control instead of Tat, no binding with TLR4-MD2 or MD2 was detected (Figure 3A). To identify the domain of Tat implicated in this interaction, the N-terminal domain containing Tat mutant Tat 1-45 and the central domain, Tat 30-72, were tested in the same assays. The results showed that the N-terminal domain, Tat 1-45, also interacted strongly with MD2 and MD2-TLR4, but not with CD14 (Figure 3A). In contrast, no binding was observed with the Tat 30-72 fragment or with GST (Figure 3A). In a parallel assay, GST-Tat 1-101, mutant Tat 1-45, mutant Tat 30-72 and GST previously coupled to glutathion-agarose, were tested for their capacity to interact with soluble recombinants TLR4-MD2, MD2 or CD14. After incubation and washes, the preformed complexes were analyzed by SDS-PAGE and western blot. The corresponding results, shown in Figure 3B, clearly confirmed the capacity

of Tat to interact, via its N-terminal fragment, with TLR4-MD2 and MD2, but not with CD14 or GST. Similar results, in line with those of the binding assay, were obtained when the same experiments were performed using, as source of TLR4/MD2/CD14, cell lysate proteins prepared from HEK293T cells stably transfected with TLR4-CD14-MD2 (Figure 3C) or from primary human monocytes (Figure 3D-E). Non-transfected HEK cells were used as controls (Figure 3C). Interestingly, treatment of monocytes with Tat followed by immunoprecipitation with anti-TLR4 antibodies allowed co-immunoprecipitation of total Tat protein and the N-terminal Tat 1-45 to be detected, but not the deleted mutant Tat 30-72 nor GST alone (Figure 3E).

In order to demonstrate the specificity of this binding, Tat-MD2 or Tat-TLR4-MD2 interactions were performed in the presence of various concentrations of MD2 (Figure 4A-B) or Tat (Figure 4C-D). The results in Figure 4A-B, show that Tat (1 μ M) binds to MD2 (1 pg/mL to 1 μ g/mL) in a dose dependent manner, with a clear saturation plateau. Similarly, the binding of MD2 (1 ng/mL) to increasing amounts of Tat (10^{-12} to 10^{-6} M) showed that the formation of Tat-MD2 or Tat-TLR4-MD2 complexes were dependent on the Tat concentration, with a saturation plateau at 10^{-6} M of Tat (Figure 4C-D).

The specificity of Tat-MD2 and Tat-TLR4-MD2 interactions were further characterized by testing the capacity of soluble MD2, TLR4-MD2, TLR4 or CD14 to compete for the inhibition of these interactions. The results depicted in Figure 4E, clearly show the capacity of soluble MD2 (1 pg - 1 μ g) to inhibit the binding of Tat to coated MD2 in a dose dependent manner (Figure 4E). Strong inhibition (more than 95%) was obtained with soluble MD2 used at 1 μ g. The concentration of soluble MD2 ($K_{0.5}$) capable of inhibiting Tat-MD2 interaction by 50% was about $4 \cdot 10^{-9}$ M. This value of $K_{0.5}$, which can be considered as an apparent dissociation constant, indicates that Tat recognizes MD2 with a relatively high affinity. Similar results were obtained when soluble MD2 was used to compete for MD2-Tat 1-45 interaction (supplementary data). In agreement with the direct binding data, soluble TLR4-MD2 is also able to totally inhibit Tat-MD2 (Figure 4E) or Tat-TLR4-MD2 (supplementary data) interactions when used at 1 μ M. The $K_{0.5}$ of TLR4-MD2, about 10^{-9} M, is 2.5 times less than that obtained with MD2 alone, suggesting a higher affinity of MD2 when it is associated with TLR4. In contrast, when soluble TLR4 or CD14 were used as competitors, no inhibition was observed (Figure 4E).

Then we wondered whether Tat protein was able to bind and to localize with TLR4 at the cell surface of HEK cells stably transfected with TLR4-MD2-CD14. Non-transfected HEK, HEK Null, were used as negative control. To this end, Tat-TLR4-MD2 interaction was labelled

with stained anti-Tat (Tat-555) and anti-TLR4 (TLR4-488) antibodies and complex formation was analyzed by confocal microscopy (Figure 5). Briefly, cells were incubated or not with Tat, and then labelled with anti-Tat or anti-TLR4 antibodies, separately or in a mixture. The results of this analysis showed that Tat protein and its N-terminal fragment Tat 1-45 were able to bind to HEK-TLR4-MD2 cells but not to HEK null (Figure 5A). This labelling was specific since no staining was observed when experiments were performed after: i) incubating cells with the same amount of soluble GST protein instead of Tat (Figure 5A), ii) omitting the primary antibody or iii) using an isotype control instead of anti-Tat antibodies (data not shown). Results in Figure 5B show that Tat and TLR4-MD2 colocalize in the same sites, as indicated by the yellow staining in the merged images, on HEK-TLR4-CD14-MD2 but not in HEK Null. Statistical analysis of this colocalization, with JaCop software, reveal a pearson coefficient of correlation $r > 0,8$, which mean a strong and specific colocalization between Tat and TLR4 proteins (data not shown). This colocalization is in agreement with the ability of Tat to interact with TLR4-MD2 in the inhibition and biochemical binding assays previously performed.

Tat protein fails to stimulate TNF- α and IL-10 in macrophages from TLR4-/- mice.

To confirm the involvement of Tat-TLR4 interaction in the signaling pathways leading to cytokine production, we used genetically engineered mice deficient in various TLR or their cofactors, including MD2 and CD14. Firstly, we validated the ability of Tat protein to stimulate the production of TNF- α and IL-10. Our results showed that Tat protein and its N-terminal Tat 1-45, but not Tat 30-72, stimulated, specifically and in a dose dependent manner TNF- α and IL-10 production in wild type murine macrophages (Figure 6A-B). In agreement with the implication of TLR4-MD2, we showed that, when murine macrophages from TLR4-/- mice were stimulated in the same conditions, no production of TNF- α and IL-10 was observed (Figure 6C-D). Similar results were obtained with macrophages from C3H/HeJ mice, which have a missense mutation in the third exon of TLR4 (supplementary data). In accordance with the selective involvement of TLR4, our results showed that Tat protein and Tat 1-45, continued to stimulate TNF- α and IL-10 production in macrophages from mice deficient for TLR2-/- TLR3-/-, TLR7-/- or TLR9-/- (data not shown). As a positive control we showed that TLR2 pathway was not altered in macrophages obtained from TLR4 KO mice as shown by cytokines production following stimulation with Pam3CsK4 ligand (Figure 6C-D).

Considering the role of MD2 in interacting with Tat protein, we evaluated the importance of the *in vivo* expression of this cofactor in the induction of the signaling pathway leading to Tat-induced cytokine production. Using macrophages from MD2^{-/-} mice, we showed that deficiency in MD2 abolished the ability of Tat to induce the production of both TNF- α and IL-10 (Figure 6E-F). Using the same approach, the implication of CD14 was also evaluated by using macrophages obtained from CD14^{-/-} mice. Unexpectedly, despite the absence of direct Tat-CD14 interaction (Figure 3A-B), the presence of CD14 expression seems to be essential for the activation of TLR4-MD2 signaling pathway by Tat as shown by the absence of cytokine production (Figure 6E-F). However, these data seem to be in apparent contradiction with those obtained with blockade anti-MD2 and anti-CD14 antibodies, which were unable to block Tat-induced TNF- α and IL-10 production (Figure 6G-H). As controls, and in agreement with previously reported data, the same antibodies completely blocked LPS-induced cytokine production (Figure 6G-H). We also confirmed that stimulation with LPS at relatively high concentrations restored cytokine production in macrophages from CD14 deficient mice (data not shown). However, the apparent discrepancy between approaches using macrophages from mice deficient for MD2 (MD2^{-/-}) or CD14 (CD14^{-/-}) and the inability of anti-MD2 or anti-CD14 antibodies to efficiently inhibit Tat-induced cytokine production may be related to the importance of MD2 in TLR4 cell surface expression and to the role of CD14 in the expression of a biologically active TLR4 and its recruitment at the signaling platform.

Our data suggest and confirm the essential implication of TLR4 and its cofactors CD14 and MD2 in HIV-1 Tat signaling require for the production of IL-10 and TNF- α in monocytes/macrophages.

Tat-TLR4 interaction leads to TLR4 down-modulation and SOCS1 and SOCS3 activation.

In these experiments, we tested the effect of Tat protein on the regulation of cell surface TLR4 and the expression of SOCS1 and SOCS3, two SOCS proteins associated with HIV-1 infection and disease progression (78, 79).

To assess the effect of Tat on TLR4 cell membrane expression, the promonocytic cell line U937 or primary human monocytes were treated for various time periods (1 h – 4 h) in the presence of Tat (10 nM) or its N-terminal fragment Tat 1-45, or GST. Anti-TLR4 antibodies were then added and FACS analysis performed. The results depicted in Figure 7A

show that treatment of cells with Tat protein or its N-terminal fragment Tat 1-45, but not with GST, induced a down-modulation of TLR4 (Figure 7A). This effect was observed on U937, HEK-TLR4-MD2-CD14 cell lines and primary human monocytes starting from 60 min post-stimulation (Figure 7A). This labelling was totally abolished when cells were previously treated in the presence of saturating concentrations of anti-TLR4 blocking antibodies, indicating that Tat effect was specific (Figure 7B). Furthermore, pretreatment of cells with dynasore, a dynamin-dependent endosomal scission inhibitor, inhibited Tat-TLR4 internalization (Figure 7C) and TNF- α and IL-10 production (Figure 8C-D). These results strongly suggest that Tat-mediated internalization of TLR4 is dynamin dependent and surface expression of TLR4 is essential for cytokine production. We therefore analyzed the importance of the integrity of the plasma membrane for TLR4 expression and Tat-induced TNF- α and IL-10 production. To this end, human monocytes were treated with methyl- β -cyclodextrin (M- β CD), to selectively extract cholesterol from the plasma membrane, and then TLR4 membrane expression and cytokine production were determined. In these conditions, we showed that M- β CD treatment, for 10 to 60 min, had no significant effect on TLR4 expression (data not shown), while TNF- α and IL-10 productions were strongly inhibited (Figure 8A-B). These results underlined the importance of lipid raft structures in Tat mediated TLR4-MD2 signaling pathways.

We next investigated whether, in parallel to TLR4 internalization, Tat also recruited the SOCS pathway as a second level of regulation. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) form a family of 8 members (SOCS1-SOCS7 and CIS). In addition to their involvement in the regulation of the TLR pathway (80), SOCS proteins are involved in the attenuation of innate immunity. An increase of SOCS1 and SOCS3 proteins has been previously described to be associated with HIV-1 viral load and disease progression both in the SIV macaque model and in HIV-1 infected humans (78, 79, 81). Thus, we focused on the effect of Tat protein on the induction of SOCS1 and SOCS3 in the present study.

Human monocytes, dendritic cells or HEK-TLR4-MD2-CD14 cell line were treated with Tat protein for 24 hours, and SOCS1 or SOCS3 induction was evaluated in cell extracts after SDS-PAGE and western blotting using specific antibodies. The results presented in Figure 9, showed that Tat protein, like its N-terminal fragment Tat1-45 (100 nM), but not Tat 30-72 or GST alone, stimulated SOCS1 and SOCS3 expression. To further characterize the relationship between Tat-TLR4 interaction and SOCS1 or SOCS3 induction, HEK null or HEK cells stably transfected with TLR4-MD2-CD14 were stimulated by Tat and tested for SOCS1 production. The data show that SOCS1 activation was observed only in TLR4-CD14-MD2

positive cells (Figure 9B). In addition, no SOCS activation was detected in HEK null cells, non-transfected with TLR4. Also, SOCS1 and SOCS3 proteins induction were totally inhibited when the stimulation was performed with blockade anti-Tat antibodies (Figure 9B). As positive control, we showed that SOCS1 and SOCS3 are expressed in cells when stimulated with LPS and/or IFN- γ (Figure 9A-B). Taken together, our results show that SOCS1 and SOCS3 activation and expression were induced upon Tat-TLR4 interaction.

DISCUSSION

In this work, we have shown that Tat protein stimulates the production of proinflammatory (TNF α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines. This cytokine production is mediated by the N-terminal region 1-45 of Tat, which lacks the basic domain essential for cell penetration and nuclear localization (41, 53). Thus, our results demonstrate that Tat protein stimulates cytokine production by acting at the cell membrane level. This interpretation is in agreement with our observation that Tat protein, previously immobilized in well culture to prevent its cellular penetration, continues to stimulate TNF- α and IL-10 cytokines in primary human monocyte (41-43). In agreement with this conclusion, several reports have shown that Tat protein is able to bind to cell membrane and several receptors have been proposed by different groups including $\alpha v \beta 1$, and $\alpha 5 \beta 3$ (82, 83), CD26 (71), CCR2, CCR3 and CXCR4 (84-87), V-EGF and β -FGF (88-91) and L-Type calcium channel (45, 92, 93). However Tat-TLR4 interaction has not been reported previously. Numerous arguments in favour of this possibility allowed us to test this hypothesis: i) TLR4 is expressed by human monocytes, ii) TLR4 have been reported, in addition to LPS, to interact with several other ligands including viral proteins (94-97), iii) TLR4 activation induces the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines including TNF- α and IL-10, by activating MAPkinases, PKC and NF- κ B pathways that we have previously demonstrated to be activated by Tat in primary human monocytes (41-47, 74).

In agreement with this hypothesis, our results showed that Tat-induced TNF- α and IL-10 production was strongly inhibited in the presence of anti-TLR4 blocking antibody. A total inhibition of cytokine production was also observed in the presence of anti-Tat antibodies, excluding contamination with endotoxins. Kinetic analysis of Tat-TLR4 interaction was also

performed. In these experiments, Tat was previously incubated for various time periods with monocytes before adding anti-TLR4 antibody. In these conditions, when anti-TLR4 antibodies were added 5 min post-Tat treatment, a great capacity of inhibition was conserved, whereas this effect diminished greatly when antibodies were added 30 min later, suggesting that Tat rapidly (in less than 30 min) and irreversibly stimulated signaling pathways leading to cytokine production.

In order to be expressed at the cell surface, and functional, TLR4 requires the action of several factors including MD2 and CD14, which form complexes at the cell membrane. Analysis of Tat interaction with TLR4-MD2, MD2 and CD14 showed that Tat protein was able to interact with TLR4-MD2 and MD2 but not with CD14. This binding was totally inhibited, in a dose dependent manner, with soluble TLR4-MD2 or MD2, demonstrating the specificity of these interactions. This finding is in line with confocal microscopy analysis, which detected colocalization of Tat and TLR4 only in TLR4-MD2 expressing cells. Comparison of the dissociation constant values $K_{0.5}$ of Tat-TLR4-MD2 (10^{-9} M) and Tat-MD2 (4.10^{-9} M), showed that $K_{0.5}$ of Tat-TLR4-MD2 was 2.5 times smaller than that of Tat-MD2. This higher affinity of Tat for TLR4-MD2 complex may be due to a better stabilization of Tat interactions with the TLR4-MD2 complex than with the MD2 alone. TLR4, like other pattern recognition receptors (PRR), have evolved to interact with several cofactors and adapters, and also with a variety of pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Accordingly, in addition to the well-characterized bacterial ligand, LPS, TLR4 recognizes many other ligands. Viral and endogenous related ligands have been reported, including respiratory syncytial virus F protein (95), mouse mammary-tumour virus envelope protein (96) and oligosaccharide of hyaluronic acid (98). In consequence, this recognition of TLR by self-antigens has been associated with the development of some autoimmune diseases including lupus, arthritis, psoriasis and metabolic or inflammatory disorders such as diabetes or atherosclerosis (99). Interestingly, it has been shown that the N-terminal domain of Tat shares more than 67% of sequence homology with the fusion peptide of the glycoprotein of MMTV. It will be interesting to synthesize this domain of MMTV glycoprotein and test its capacity to compete or act in synergy with Tat action. It has been shown that LPS recognizes MD2 with a dissociation constant of about 2.3×10^{-6} M (100) a $K_{0.5}$ value that is 500 times higher than that found for Tat-MD2. In addition, in our study, no detectable interaction was found between Tat and CD14 neither in the solid phase nor in pull-down binding assays, while a direct interaction between LPS and CD14 has been described in several reports (100-102).

At functional level and in agreement with our biochemical data, we showed that Tat protein and its N-terminal fragment Tat 1-45 induced the production of TNF- α and IL-10 in macrophages from wild type mice but not in macrophages from mice genetically deficient for TLR4, MD2 or CD14. While the importance of cell surface expression of TLR4 and MD2 seems to be in line with our biochemical data, results obtained with CD14 KO mice seem to be in apparent contradiction if we consider its inability to interact with Tat protein. This apparent contradiction is amplified by the fact that anti-CD14 antibodies, which continue to inhibit LPS activation, fail to inhibit Tat-induced cytokine production. This apparent discrepancy may be related to the importance of CD14 in the expression of a biologically active TLR4 or its recruitment at cholesterol rich domains corresponding to the signaling platform (77, 101). In line with this interpretation, more recently, it has been reported that CD14 plays a crucial role in the control of endocytosis of TLR4 to activate the TRIF dependent pathway (103). Also, it is interesting to note that anti-MD2 antibodies were able to block cytokine production by LPS, while these same antibodies failed to inhibit Tat-induced cytokines. These results, in association with those obtained with MD2 KO mice, also underline the role of MD2 in the trafficking and surface localization of TLR4 as previously reported (104). They also suggest the possibility that Tat protein recognizes a site on TLR4-MD2 different from that of LPS. However, additional molecules including gp96 (105), PRAT4A, PRAT4B and UNC93B1 (106-108), have also been reported to be involved in the correct folding and surface localization of human TLR4.

By binding to TLR4/MD2, Tat protein induced TLR4 internalization in a dose and time dependent manner when analyzed in primary human monocytes, U937 promonocytic cell line and HEK TLR4-MD2-CD14 cell line. Pretreatment of cells with anti-TLR4 blocking antibody or with dynasore, a dynamin-dependent endosomal scission inhibitor, totally abolished the down modulation effect of Tat. These results suggest the importance of Tat-TLR4/MD2 interaction for TLR4 internalization and indicate that endocytosis of TLR4 is dynamin dependent. By this mechanism, on the one hand, it negatively regulates MyD88 dependent signaling (109) and, on the other hand, after its relocation in the endosome it will have the possibility of activating TRIF signaling (110, 111). Interestingly, our results show that Tat protein initiated an alternative regulatory pathway by activating SOCS1 and SOCS3 expression. The expression of these SOCS proteins is TLR4-MD2 dependent. In agreement with previous data, this activation is also mediated by the N-terminal fragment Tat 1-45 but not with the mutant Tat 30-72. SOCS1 and SOCS3 expression is strongly inhibited in the

presence of anti-Tat antibodies. Activation of SOCS3 and SOCS1 by HIV-1 Tat protein in macrophages has been previously described by Akhtar L et al (78, 112). This activation was found to be elevated in SIV infected macaques. A similar increase of SOCS3 has been reported in human patients infected with HIV-1 and in macaques infected with SIV (81, 113). One possible explanation of this effect may be at the level of interferon type I inhibition, which in turn would allow the virus to escape control by the innate system. Indeed, SOCS3 and SOCS1 have been reported to be induced by *Mycobacterium avium* and *Toxoplasma gondii* (114) respectively. By such mechanisms, several viruses, including HSV-I (115) and Influenza A virus (116), interfere with the antiviral effects of IFN type I and type II.

Considering the crucial role of PRR in the anti-viral immune defence, some viruses have evolved multiple mechanisms to hijack the initial function of TLR to their advantage so as to escape the control of the immune system or to infect their targets. For example, murine retrovirus MMTV by its envelope protein, and the respiratory syncytial virus (RSV) by its F protein, activate TLR4 and induce IL-10 production, thereby establishing an immunosuppression state favourable for viral replication. Interestingly, other viruses have developed strategies to interfere with TLR pathway activation. For example, vaccinia virus, by its A46R protein which shares a TIR-like domain, interferes with the TLR pathway to block both MyD88 dependent and independent signaling (117). Similarly, hepatitis virus C by its NS5A protein, forms insoluble complexes with MyD88 and inhibits the activation of the TLR4 pathway in murine macrophages (118). Measles virus by its hemagglutinin, interacts with TLR2 on human monocytes and activates the expression of CD150, that is its own entry receptor. These reports indicate that TLR, the first line of innate immunity, can be hijacked by endogenous or viral ligands to promote the establishment of a pathological state or to escape viral containment.

Taken together, our results give the first description of a direct, high affinity interaction between HIV-1 Tat protein and TLR4/MD2. By hijacking this pathway, HIV-1, via its early expressed Tat protein, contributes to the establishment of an abnormal activation of the immune system via TNF- α , to the development of an immunosuppression state by the production of IL-10, a highly immunosuppressive cytokine, and the expression of negative signaling factors like SOCS1 and SOCS3.

REFERENCES

1. Li Q, et al. (2005) Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells. *Nature* 434(7037):1148-1152.
2. Guadalupe M, et al. (2003) Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* 77(21):11708-11717.
3. Gordon SN, et al. (2007) Severe depletion of mucosal CD4⁺ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol* 179(5):3026-3034.
4. Pandrea IV, et al. (2007) Acute loss of intestinal CD4⁺ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J Immunol* 179(5):3035-3046.
5. Brenchley JM, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine* 12(12):1365-1371.
6. Brenchley JM, Price DA, & Douek DC (2006) HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology* 7(3):235-239.
7. Pollakis G & Paxton WA (2012) Use of (alternative) coreceptors for HIV entry. *Current opinion in HIV and AIDS* 7(5):440-449.
8. Uchil PD & Mothes W (2009) HIV Entry Revisited. *Cell* 137(3):402-404.
9. Boasso A & Shearer GM (2008) Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol* 126(3):235-242.
10. d'Ettorre G, Paiardini M, Ceccarelli G, Silvestri G, & Vullo V (2011) HIV-associated immune activation: from bench to bedside. *AIDS research and human retroviruses* 27(4):355-364.
11. d'Ettorre G, et al. (2011) HIV persistence in the gut mucosa of HIV-infected subjects undergoing antiretroviral therapy correlates with immune activation and increased levels of LPS. *Current HIV research* 9(3):148-153.
12. Dyer JR, Hoffman IF, Eron JJ, Jr., Fiscus SA, & Cohen MS (1999) Immune activation and plasma viral load in HIV-infected African individuals. *AIDS* 13(10):1283-1285.
13. Mir KD, et al. (2012) Simian immunodeficiency virus-induced alterations in monocyte production of tumor necrosis factor alpha contribute to reduced immune activation in sooty mangabeys. *Journal of virology* 86(14):7605-7615.
14. Bansal AK, et al. (2000) Neurotoxicity of HIV-1 proteins gp120 and Tat in the rat striatum. *Brain research* 879(1-2):42-49.
15. Borghi P, et al. (1995) Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes/macrophages. *Journal of virology* 69(2):1284-1287.
16. Chen L, et al. (2009) Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science* 326(5956):1123-1127.
17. Clerici M, et al. (1993) Alloactivated cytotoxic T cells recognize the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus-1 gp120 envelope glycoprotein. *European journal of immunology* 23(8):2022-2025.

18. Haughey NJ & Mattson MP (2002) Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31 Suppl 2:S55-61.
19. Huang CC, et al. (2007) Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* 317(5846):1930-1934.
20. Kassler K, Meier J, Eichler J, & Sticht H (2011) Structural Basis for Species Selectivity in the HIV-1 gp120-CD4 Interaction: Restoring Affinity to gp120 in Murine CD4 Mimetic Peptides. *Advances in bioinformatics* 2011:736593.
21. Wang ZQ, et al. (1994) Deletion of T lymphocytes in human CD4 transgenic mice induced by HIV-gp120 and gp120-specific antibodies from AIDS patients. *European journal of immunology* 24(7):1553-1557.
22. Choe H, et al. (2003) Tyrosine sulfation of human antibodies contributes to recognition of the CCR5 binding region of HIV-1 gp120. *Cell* 114(2):161-170.
23. Herbein G, et al. (1998) Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 395(6698):189-194.
24. van der Vlist M, van der Aar AM, Gringhuis SI, & Geijtenbeek TB (2011) Innate signaling in HIV-1 infection of dendritic cells. *Current opinion in HIV and AIDS* 6(5):348-352.
25. Das SR & Jameel S (2005) Biology of the HIV Nef protein. *The Indian journal of medical research* 121(4):315-332.
26. Chaudhry A, et al. (2005) The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J Immunol* 175(7):4566-4574.
27. Chaudhry A, et al. (2007) A two-pronged mechanism for HIV-1 Nef-mediated endocytosis of immune costimulatory molecules CD80 and CD86. *Cell host & microbe* 1(1):37-49.
28. Chaudhry A, et al. (2009) HIV-1 Nef promotes endocytosis of cell surface MHC class II molecules via a constitutive pathway. *J Immunol* 183(4):2415-2424.
29. Glushakova S, et al. (1999) Nef enhances human immunodeficiency virus replication and responsiveness to interleukin-2 in human lymphoid tissue ex vivo. *Journal of virology* 73(5):3968-3974.
30. Muthumani K, et al. (2005) HIV-1 Nef-induced FasL induction and bystander killing requires p38 MAPK activation. *Blood* 106(6):2059-2068.
31. Learmont JC, et al. (1999) Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *The New England journal of medicine* 340(22):1715-1722.
32. Kestler HW, 3rd, et al. (1991) Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65(4):651-662.
33. Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, & Desrosiers RC (1992) Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258(5090):1938-1941.
34. Laguette N, et al. (2011) SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474(7353):654-657.
35. Laguette N & Benkirane M (2012) How SAMHD1 changes our view of viral restriction. *Trends in immunology* 33(1):26-33.
36. Lahouassa H, et al. (2012) SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nature immunology* 13(3):223-228.

37. Meier A, et al. (2007) MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *Journal of virology* 81(15):8180-8191.
38. Beignon AS, et al. (2005) Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *The Journal of clinical investigation* 115(11):3265-3275.
39. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, & Akira S (2008) Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell host & microbe* 3(6):352-363.
40. Takeuchi O & Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-820.
41. Badou A, et al. (2000) Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *Journal of virology* 74(22):10551-10562.
42. Bennasser Y, Badou A, Tkaczuk J, & Bahraoui E (2002) Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF-alpha. *Virology* 303(1):174-180.
43. Bennasser Y, et al. (2001) [HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by human monocytes: implications of the PKC and calcium pathway]. *Journal de la Societe de biologie* 195(3):319-326.
44. Contreras X, Bennasser Y, Chazal N, & Bahraoui E (2003) [HIV-1 Tat induces TNF-alpha production by human monocytes: involvement of calcium and PKC pathways]. *Journal de la Societe de biologie* 197(3):267-275.
45. Contreras X, et al. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production. *Virology* 332(1):316-328.
46. Leghmari K, Bennasser Y, & Bahraoui E (2008) HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways. *European journal of cell biology* 87(12):947-962.
47. Leghmari K, Bennasser Y, Tkaczuk J, & Bahraoui E (2008) HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase. *Cellular immunology* 253(1-2):45-53.
48. Leghmari K, Contreras X, Moureau C, & Bahraoui E (2008) HIV-1 Tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages: differential implication of PKC-betaII and -delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38. *Cellular immunology* 254(1):46-55.
49. Zauli G, et al. (1992) tat protein stimulates production of transforming growth factor-beta 1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1-induced hematopoietic suppression. *Blood* 80(12):3036-3043.
50. Westendorp MO, Li-Weber M, Frank RW, & Krammer PH (1994) Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *Journal of virology* 68(7):4177-4185.
51. Scala G, et al. (1994) The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *The Journal of experimental medicine* 179(3):961-971.
52. Lotz M, Clark-Lewis I, & Ganu V (1994) HIV-1 transactivator protein Tat induces proliferation and TGF beta expression in human articular chondrocytes. *The Journal of cell biology* 124(3):365-371.
53. Johri MK, Mishra R, Chhatbar C, Unni SK, & Singh SK (2011) Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert opinion on biological therapy* 11(3):269-283.

54. Feng S & Holland EC (1988) HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334(6178):165-167.
55. Westendorp MO, et al. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375(6531):497-500.
56. Goldstein G (1996) HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine. *Nature medicine* 2(9):960-964.
57. Tyagi M, Rusnati M, Presta M, & Giacca M (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of biological chemistry* 276(5):3254-3261.
58. Urbinati C, et al. (2009) HIV-1 Tat and heparan sulfate proteoglycan interaction: a novel mechanism of lymphocyte adhesion and migration across the endothelium. *Blood* 114(15):3335-3342.
59. Buonaguro L, et al. (1992) Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *Journal of virology* 66(12):7159-7167.
60. Ensoli B, et al. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *Journal of virology* 67(1):277-287.
61. Ensoli B, et al. (1994) Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* 371(6499):674-680.
62. Howcroft TK, Strebel K, Martin MA, & Singer DS (1993) Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* 260(5112):1320-1322.
63. Li CJ, et al. (1997) Tat protein induces self-perpetuating permissivity for productive HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(15):8116-8120.
64. Sabatier JM, et al. (1991) Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 65(2):961-967.
65. Nath A, et al. (1996) Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. *Journal of virology* 70(3):1475-1480.
66. Kim TA, et al. (2003) HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *J Immunol* 170(5):2629-2637.
67. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, & Pardee AB (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268(5209):429-431.
68. Zhang M, et al. (2002) Bcl-2 upregulation by HIV-1 Tat during infection of primary human macrophages in culture. *Journal of biomedical science* 9(2):133-139.
69. Ito M, et al. (1998) HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS research and human retroviruses* 14(10):845-849.
70. Flores SC, et al. (1993) Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(16):7632-7636.
71. Gutheil WG, et al. (1994) Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(14):6594-6598.
72. Rubartelli A, Poggi A, & Zocchi MR (1997) The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the $\alpha(v)\beta3$ integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *European journal of immunology* 27(8):1893-1900.

73. Albini A, et al. (1996) The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nature medicine* 2(12):1371-1375.
74. Contreras X, Bennasser Y, & Bahraoui E (2004) IL-10 production induced by HIV-1 Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC beta(II) and delta isozymes. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6(13):1182-1190.
75. Akira S (2006) TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology* 311:1-16.
76. Grela F, et al. (2011) The TLR7 agonist R848 alleviates allergic inflammation by targeting invariant NKT cells to produce IFN-gamma. *J Immunol* 186(1):284-290.
77. Lee CC, Avalos AM, & Ploegh HL (2012) Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature reviews. Immunology* 12(3):168-179.
78. Akhtar LN & Benveniste EN (2011) Viral exploitation of host SOCS protein functions. *Journal of virology* 85(5):1912-1921.
79. Miller RC, et al. (2011) HIV interferes with SOCS-1 and -3 expression levels driving immune activation. *European journal of immunology* 41(4):1058-1069.
80. Yoshimura A, Naka T, & Kubo M (2007) SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. *Nature reviews. Immunology* 7(6):454-465.
81. Ryo A, et al. (2008) SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(1):294-299.
82. Barillari G, et al. (1999) The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood* 94(2):663-672.
83. Barillari G, et al. (1999) Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the alpha v beta 3 integrin. *J Immunol* 163(4):1929-1935.
84. El-Hage N, et al. (2006) CCR2 mediates increases in glial activation caused by exposure to HIV-1 Tat and opiates. *Journal of neuroimmunology* 178(1-2):9-16.
85. de Paulis A, et al. (2000) Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human Fc epsilon RI+ cells. *J Immunol* 165(12):7171-7179.
86. Ghezzi S, et al. (2000) Inhibition of CXCR4-dependent HIV-1 infection by extracellular HIV-1 Tat. *Biochemical and biophysical research communications* 270(3):992-996.
87. Giovannetti A, et al. (1999) CCR5 and CXCR4 chemokine receptor expression and beta-chemokine production during early T cell repopulation induced by highly active anti-retroviral therapy. *Clinical and experimental immunology* 118(1):87-94.
88. Katayama M, et al. (2002) [POEMS syndrome with increased vascular endothelial growth factor (VEGF) and multiple osteosclerotic lesion]. *Nihon Naika Gakkai zasshi. The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine* 91(6):1864-1866.
89. Morini M, et al. (2000) Kaposi's sarcoma cells of different etiologic origins respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): relevance in AIDS-KS pathology. *Biochemical and biophysical research communications* 273(1):267-271.

90. Rubio Demirovic A, et al. (2003) HIV TAT basic peptide is not a high-affinity ligand for VEGF receptor 2. *Biological chemistry* 384(10-11):1435-1441.
91. Urbinati C, et al. (2012) Substrate-immobilized HIV-1 Tat drives VEGFR2/ $\alpha(v)\beta(3)$ -integrin complex formation and polarization in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(5):e25-34.
92. Poggi A, Rubartelli A, & Zocchi MR (1998) Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat. *The Journal of biological chemistry* 273(13):7205-7209.
93. Zocchi MR, Rubartelli A, Morgavi P, & Poggi A (1998) HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J Immunol* 161(6):2938-2943.
94. Datta A, Sinha-Datta U, Dhillon NK, Buch S, & Nicot C (2006) The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. *The Journal of biological chemistry* 281(33):23414-23424.
95. Kurt-Jones EA, et al. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology* 1(5):398-401.
96. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, & Ross SR (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(4):2281-2286.
97. Shingai M, et al. (2008) Soluble G protein of respiratory syncytial virus inhibits Toll-like receptor 3/4-mediated IFN-beta induction. *International immunology* 20(9):1169-1180.
98. Termeer C, et al. (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* 195(1):99-111.
99. Mills KH (2011) TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* 11(12):807-822.
100. Shin HJ, et al. (2007) Kinetics of binding of LPS to recombinant CD14, TLR4, and MD-2 proteins. *Molecules and cells* 24(1):119-124.
101. Kirkland TN, et al. (1993) Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. *The Journal of biological chemistry* 268(33):24818-24823.
102. Thomas CJ, et al. (2002) Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response. *FEBS letters* 531(2):184-188.
103. Zanoni I, et al. (2011) CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 147(4):868-880.
104. Nagai Y, et al. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature immunology* 3(7):667-672.
105. Randow F & Seed B (2001) Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nature cell biology* 3(10):891-896.
106. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, & Ploegh HL (2008) UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452(7184):234-238.
107. Konno K, et al. (2006) A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulates its cell surface expression. *Biochemical and biophysical research communications* 339(4):1076-1082.

108. Takahashi K, et al. (2007) A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *The Journal of experimental medicine* 204(12):2963-2976.
109. Husebye H, et al. (2006) Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO journal* 25(4):683-692.
110. Kagan JC & Medzhitov R (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125(5):943-955.
111. Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, & Miyake K (2008) Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 368(1):94-99.
112. Akhtar LN, et al. (2010) Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits antiviral IFN-beta signaling to enhance HIV-1 replication in macrophages. *J Immunol* 185(4):2393-2404.
113. Ogata H, et al. (2006) Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 131(1):179-193.
114. Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, & Dalpke AH (2006) Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J Immunol* 176(3):1840-1847.
115. Frey KG, et al. (2009) HSV-1-induced SOCS-1 expression in keratinocytes: use of a SOCS-1 antagonist to block a novel mechanism of viral immune evasion. *J Immunol* 183(2):1253-1262.
116. Pauli EK, et al. (2008) Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS pathogens* 4(11):e1000196.
117. Lysakova-Devine T, et al. (2010) Viral inhibitory peptide of TLR4, a peptide derived from vaccinia protein A46, specifically inhibits TLR4 by directly targeting MyD88 adaptor-like and TRIF-related adaptor molecule. *J Immunol* 185(7):4261-4271.
118. Abe T, et al. (2007) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *Journal of virology* 81(17):8953-8966.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1. Tat induces TNF- α and IL-10 production by its N-terminal domain 1-45.

A) Monocytes (10^6) were incubated with total Tat protein: GST-Tat 1-101 or deleted mutants GST-Tat 30-72 or 1-45 (1, 10 nM). GST (10 nM) was used as control. **B)** In the same conditions, monocytes were stimulated with indicated amounts of recombinant or synthetic Tat protein. After 24 h of stimulation, TNF- α and IL-10 production were measured in culture supernatants by ELISA. Cytokine production is expressed in pg/ml. The data represent means and standard deviation (SD) of three independent experiments.

C) Inhibition of cytokines induced by Tat (10 nM) in the presence of Mab (2 μ g/ml) directed against Tat 1-15 or a mixture of 3 Mabs directed against 3 B-cell epitopes of Tat, localized within regions 1-15, 46-60 and 74-86 of Tat. Mabs were pre-incubated with Tat before stimulation of the monocytes for 24h. Results are representative of the ratio P/P_0 between Tat cytokine production using incubation with Mabs (P) and cytokine production obtained by Tat alone (P_0).

D) Monocytes were incubated with native Tat, heated Tat (10 min at 100°C), oxidized Tat (1 h at 25°C in 3% H₂O₂) or trypsin-digested Tat (1 h at 37°C) for 24 h. As controls, the same treatments were used for LPS and cytokine production was determined by ELISA. The data represent mean \pm SD ($n \geq 3$).

Figure 2. HIV-1 Tat-protein-induced TNF α and IL-10 is TLR4-dependent.

A-B) Monocytes were pretreated or not with increasing amounts of blocking antibodies against TLR4 or TLR2 or isotype control for 1h before stimulation by GST-Tat 1-101 (100 nM).

C) Mab anti-TLR4 (1 μ g/ml) were incubated for 1 h with 10^6 primary human monocytes before stimulation with 1, 10 or 100 nM of Tat or with **D)** 100 nM of GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, or GST-Tat 30-72. GST was used as a control. Culture supernatants were recovered after 24 h and TNF- α and IL-10 were measured by ELISA.

E) Dose-response panel: Monocytes were previously treated with increasing amounts of Mab anti-TLR4 for 60 min before stimulation with Tat. Competition panel: 10 nM of Tat were pre-incubated with Mab anti-TLR4 (0.01-1 μ g/ml) before being added to the monocytes. Kinetics panel: Monocytes were pre-incubated with Tat for 5, 10, 30 or 60 min before addition of Mab anti-TLR4 antibody at 0.1 or 1 μ g/ml.

F) Monocytes were pretreated or not with anti-TLR4 antibodies at 0.1 or 1 $\mu\text{g/ml}$ for 60 min and then washed twice before stimulation by Tat (10 nM). After 24h, TNF- α and IL-10 were measured in the culture supernatants by ELISA. The results are expressed in pg/ml. The values are representative of at least three independent experiments.

Figure 3. Tat protein and its N-terminal fragment Tat 1-45 interact physically with TLR4-MD2 and MD2 but not with CD14.

A) Recombinant human TLR4-MD2, MD2 and CD14 were coated at 1 $\mu\text{g/ml}$ in the wells. After incubation with GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST control (1 μM), interaction of Tat with coated recombinant human proteins was analyzed by ELISA. The data represent OD at 450 nm and are representative of one of three independent experiments.

B) Recombinant human TLR4-MD2, MD2 and CD14 (1 $\mu\text{g/ml}$) were incubated with GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST control (1 μM) coupled to glutathione-agarose beads. **C-D)** GST-pull down experiments. 500 μg of cellular extracts from HEK cell expressing TLR4-MD2-CD14 or not (C), or from primary human monocytes (D) were incubated or not with 1 μM of glutathione-agarose beads coupled to GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST as control. After incubation, interaction of Tat with TLR4-MD2, MD2 or CD14 was analyzed by western blot using specific antibodies. Soluble TLR4-MD2 (sTLR4) was used as positive control.

E) Purified human monocytes (10^7) were stimulated for 20 min with 1 μM of Tat, deleted mutants, or GST. After immunoprecipitation with Mab anti-TLR4, the presence of GST, Tat or Tat deleted mutants were analyzed by SDS-PAGE and WB.

Figure 4. Tat interacts specifically and with high affinity with MD2 and TLR4-MD2.

A-B) Increasing amounts of rhMD2 were coated in the wells. After incubation with a constant amount of GST-Tat 1-101 or GST-Tat 1-45 (1 μM), the binding of Tat to rhMD2 was detected by using anti-GST antibodies (1/500). The data represent OD at 450 nm \pm SD (triplicate) and are representative of one of three independent experiments.

C-D) Increasing concentrations of GST-Tat 1-101 or GST-Tat 1-45 were incubated for 2 h with 10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ of coated rhMD2. The data represent OD at 450 nm \pm SD (triplicate) and are representative of one of three independent experiments.

E) rhMD2 and rhTLR4-MD2 compete for Tat-rhMD2 interaction: GST-Tat 1-101 (0.1 μM) were pre-incubated for 1 h with PBS (control) or with increasing amounts of soluble rhMD2, rhTLR4-MD2, rhTLR4 or rhCD14 before incubation with the coated rhMD2. Binding of Tat

to rhMD2 was analyzed as described above by measuring OD at 450 nm. Data represent mean \pm SD (n \geq 3).

Figure 5. Tat colocalizes with TLR4-MD2 at the cell surface membrane.

A) HEK cells null or HEK-TLR4-MD2-CD14 were pre-incubated with GST-Tat 1-101 or GST-Tat 1-45 or control GST during 15 min. GST \pm -Tat were labelled with an anti-GST-555 antibodies (red). WGA-633 (blue) was used to label the membrane of cells and DAPI (cyan) was used as a nuclear marker.

B) HEK-TLR4-MD2-CD14 were pre-incubated with GST-Tat 1-45 during 15 min. TLR4 and Tat were labelled using primary antibody against anti-TLR4 and anti-Tat respectively. Complexes formed were then labelled with secondary antibodies against anti-Tat antibodies (Tat-555, red) and anti-TLR4 (TLR4-488, green). DAPI (blue) was used as nuclear marker. Scale bars are represented right down of each images.

Figure 6. Tat protein fails to stimulate TNF- α and IL-10 in macrophages from TLR4 $^{-/-}$ MD2 $^{-/-}$, and CD14 $^{-/-}$ mice.

A-B) Tat induces mTNF α and mIL-10 production in wild type C57Bl/6 murine macrophages. Peritoneal macrophages (5×10^5 /well) from wild type C57BL/6 mice were stimulated for 24 h with increasing concentration of GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST-Tat 30-72 or GST as control. LPS was used as a positive control for cytokine production. The concentrations of mouse TNF- α and IL-10 in the supernatants were quantified by ELISA.

C-F) TLR4, CD14 and MD2 cell surface membrane proteins are essential for TNF- α and IL-10 production by Tat. Macrophages were isolated from Wt mice or mice KO for TLR4, TLR2 (C-D) or CD14 or MD2 (E-F). The cells were stimulated with increasing concentrations of GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45 or GST as control. Positive control experiments were performed by using the following TLR ligands: LPS (TLR4-CD14-MD2) and Pam₃CsK₄ (TLR2-CD14). Mouse TNF- α and IL-10 production were determined by ELISA.

G-H) Human monocytes were pretreated with blocking antibodies, anti-CD14 or anti-MD2 (0.1 - 1 μ g/ml) for 60 min. Cells were then stimulated with GST or GST-Tat 1-101 (100 nM). The data represent means \pm SD of three independent experiments.

Figure 7. Tat induces specific dynamin endocytosis of TLR4.

A) U937, HEK TLR4- MD2-CD14 or human monocytes were stimulated or not with 10 or 100 nM of GST+/-Tat for the times indicated. Surface expression of TLR4 in unstimulated (black line) or stimulated (pink, blue and red lines) cells was analyzed by flow cytometry using anti-TLR4 or isotype control IgG (tinted) stained with secondary FITC or PE antibodies. Data represent one of three independent experiments

B) U937 were pre-incubated for 1 h with 1 µg/mL of blocking anti-TLR4 or **C)** HEK TLR4-CD14-MD2 were pretreated with 80 µM of dynasore for 30 minutes before stimulation with GST+/-Tat (100 nM) for the time periods indicated. Cell surface expression of TLR4 was then analyzed as described above.

Figure 8. The integrity of the raft domain is necessary for Tat-induced TNF-α and IL-10.

A-B) Purified human monocytes (10^6) were pretreated with increasing amounts of raft disruption drug M-βCD (10, 60 min) or **C-D)** dynasore for 30 minutes before stimulation with GST-Tat 1-101 (100 nM) or LPS (10 ng/mL). After 24 h, IL-10 and TNF-α production in culture supernatants were quantified by ELISA. The data represent means and SD (n >3). As controls, cells were stimulated with PBS, DMSO or the highest drug concentration and cytokine production and cytotoxicity (trypan blue) were analyzed.

Figure 9. By its 1-45 domain, HIV-1 Tat induces of SOCS1 and SOCS3 expression.

A) Human monocytes, dendritic cells or HEK TLR4 CD14 MD2 cells (10^6) were stimulated or not for 24 h with Tat (100 nM) and tested for SOCS1 expression by immunoblot using specific Abs. As a positive control, SOCS1 expression was stimulated with LPS (10 ng/mL) or LPS + IFN-γ (10 ng/mL). Actin was used as a loading control.

B) HEK Null used as control or HEK cell line expressing TLR4-CD14-MD2 were stimulated with GST-Tat 1-45 (100 nM), GST-Tat30-72 (100 nM) or LPS (10 ng/mL) +/- IFN-γ (10 ng/ml). The specificity of the Tat effect was tested by neutralizing its effect with anti Tat antibodies at 1 µg/mL. Stimulation with GST or anti-Tat alone were used as controls. Protein was subjected to immunoblot analysis with Abs specific to SOCS1 or SOCS3. Actin was used as a loading control.

Figure 1.

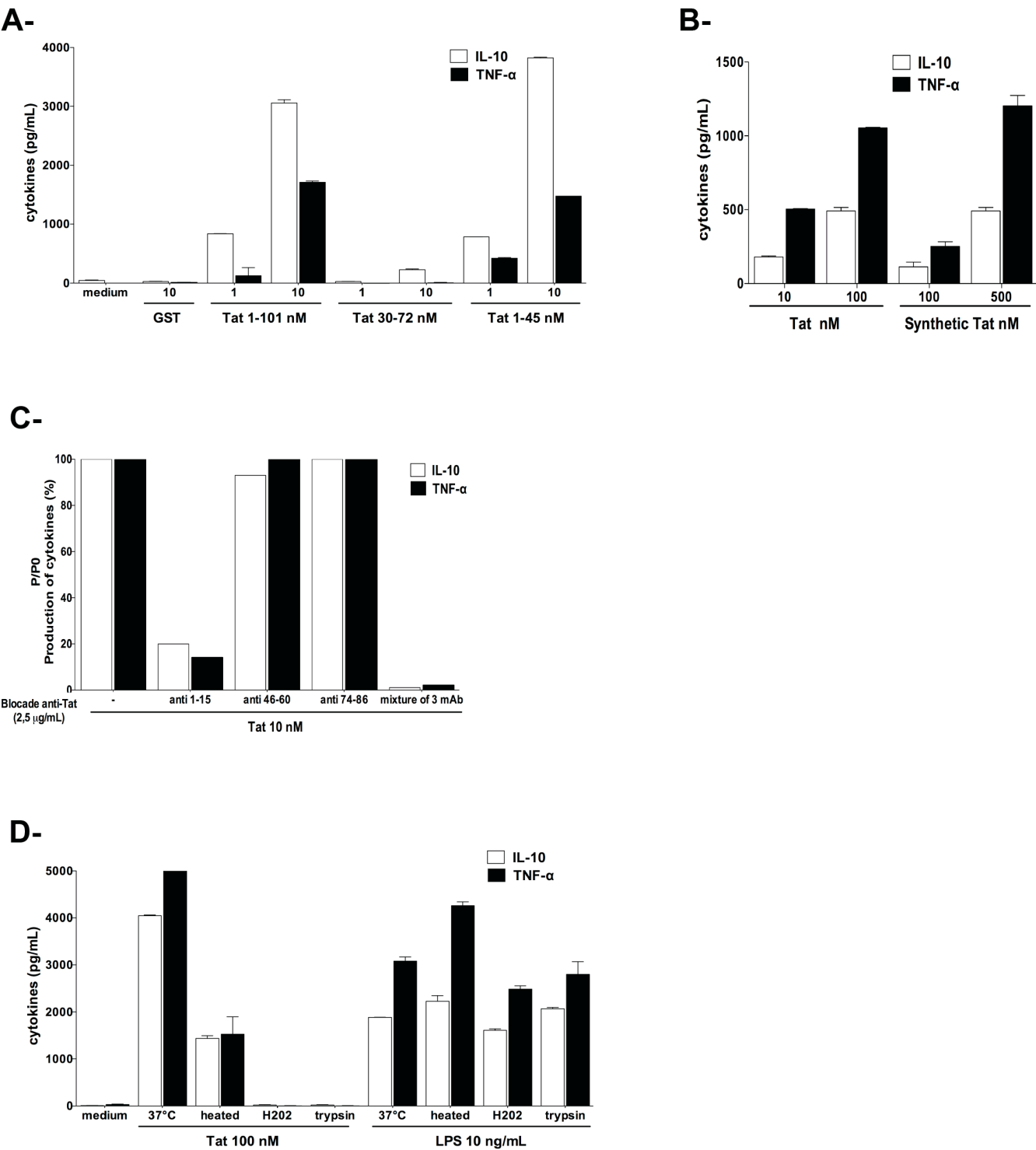


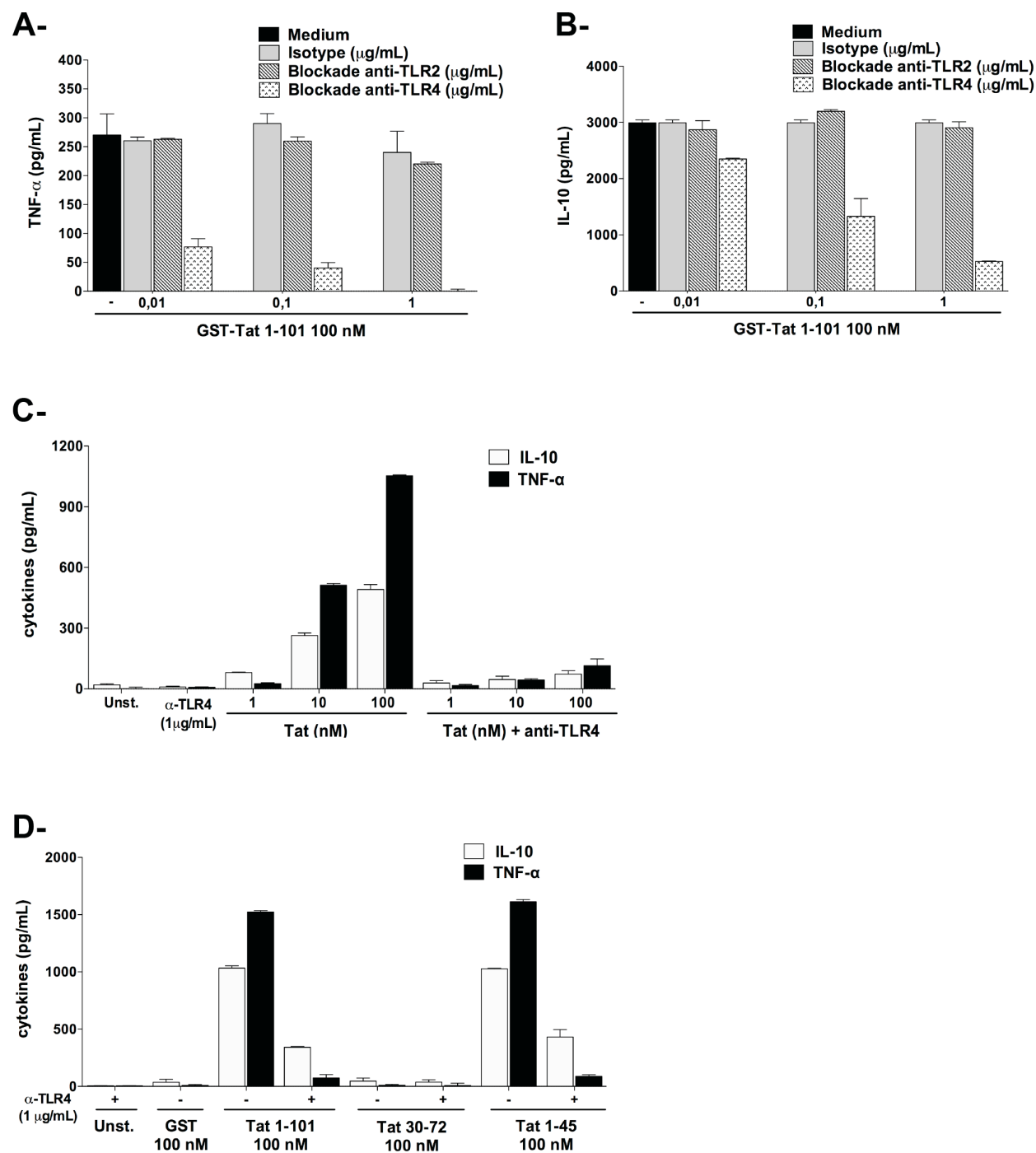
Figure 2.

Figure 2.

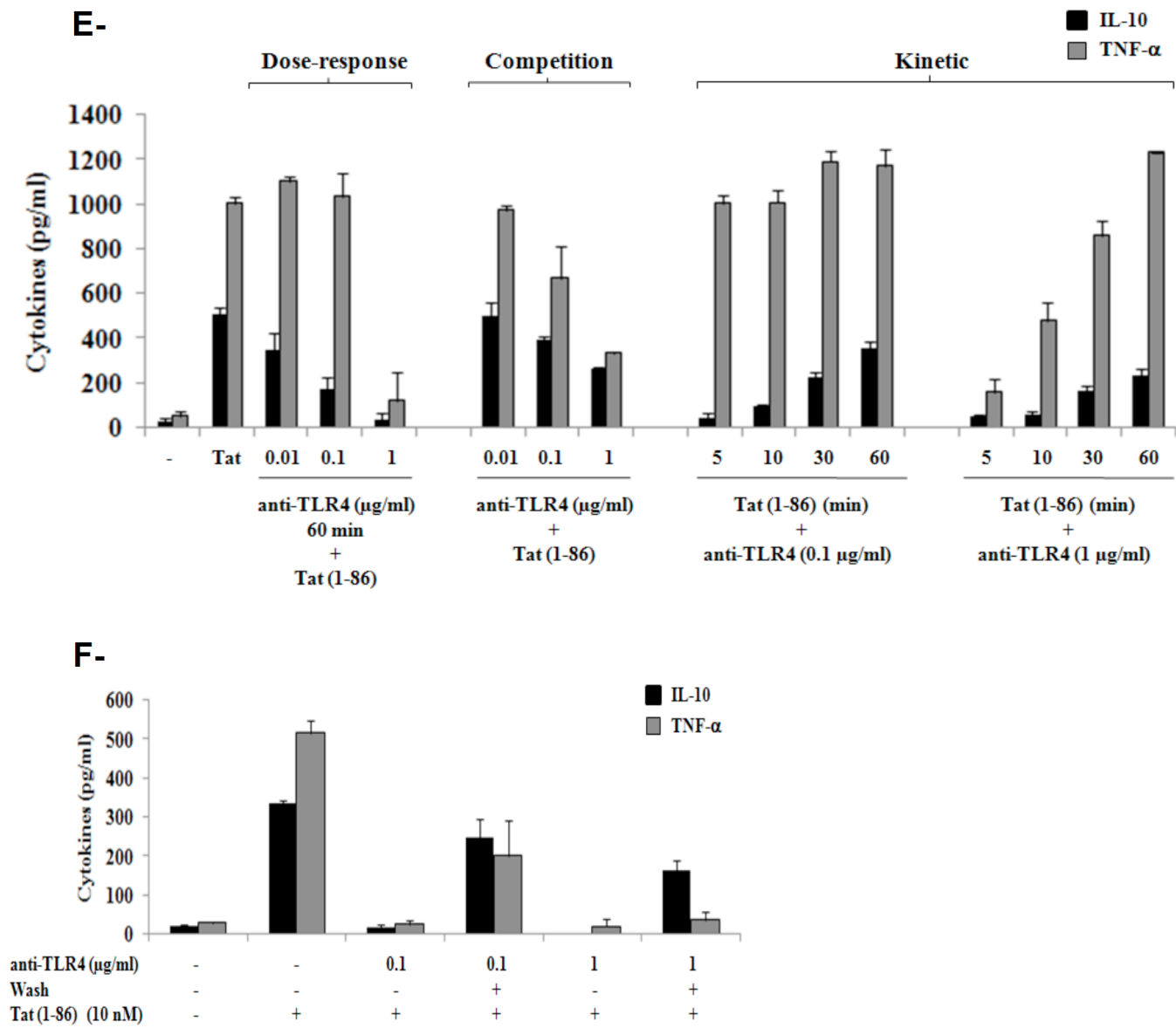


Figure 3.

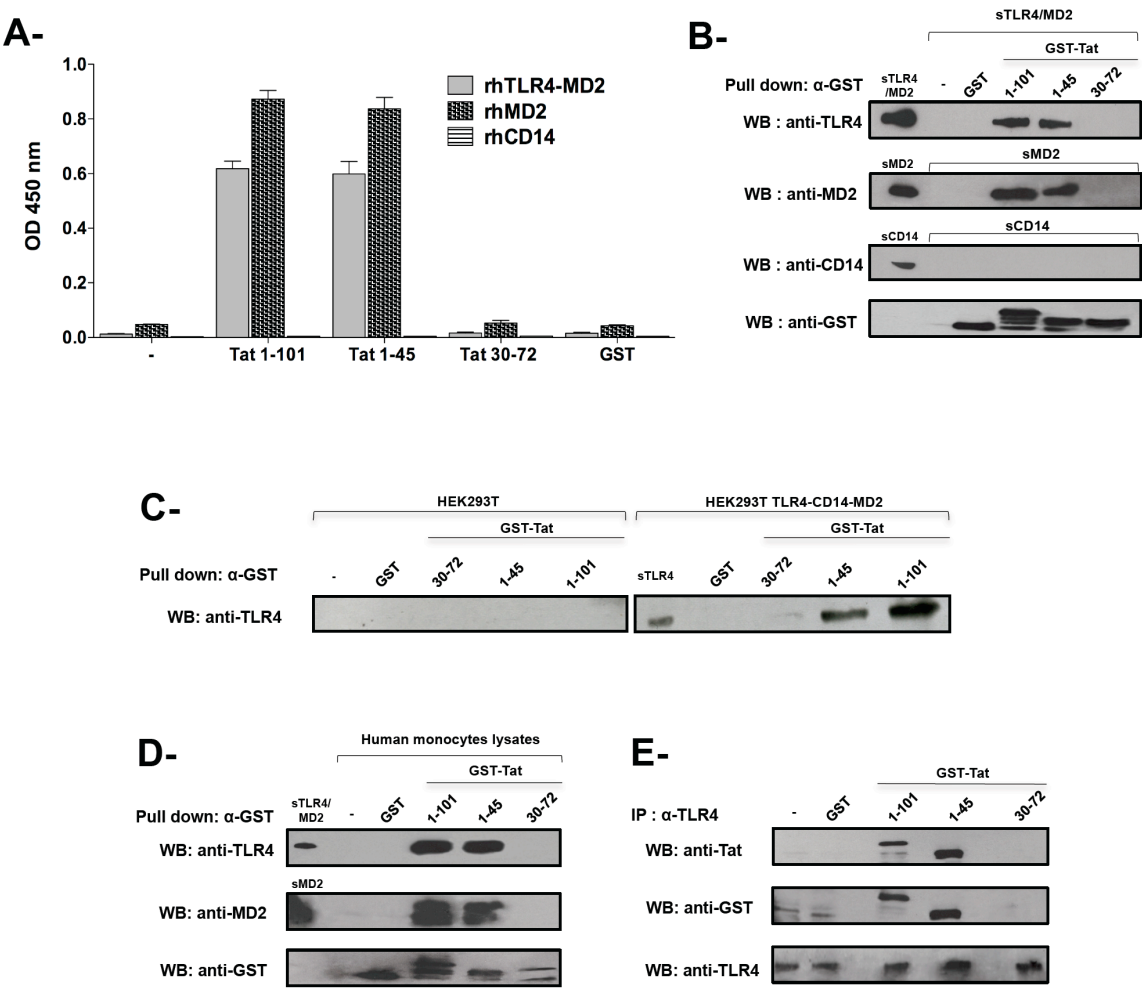


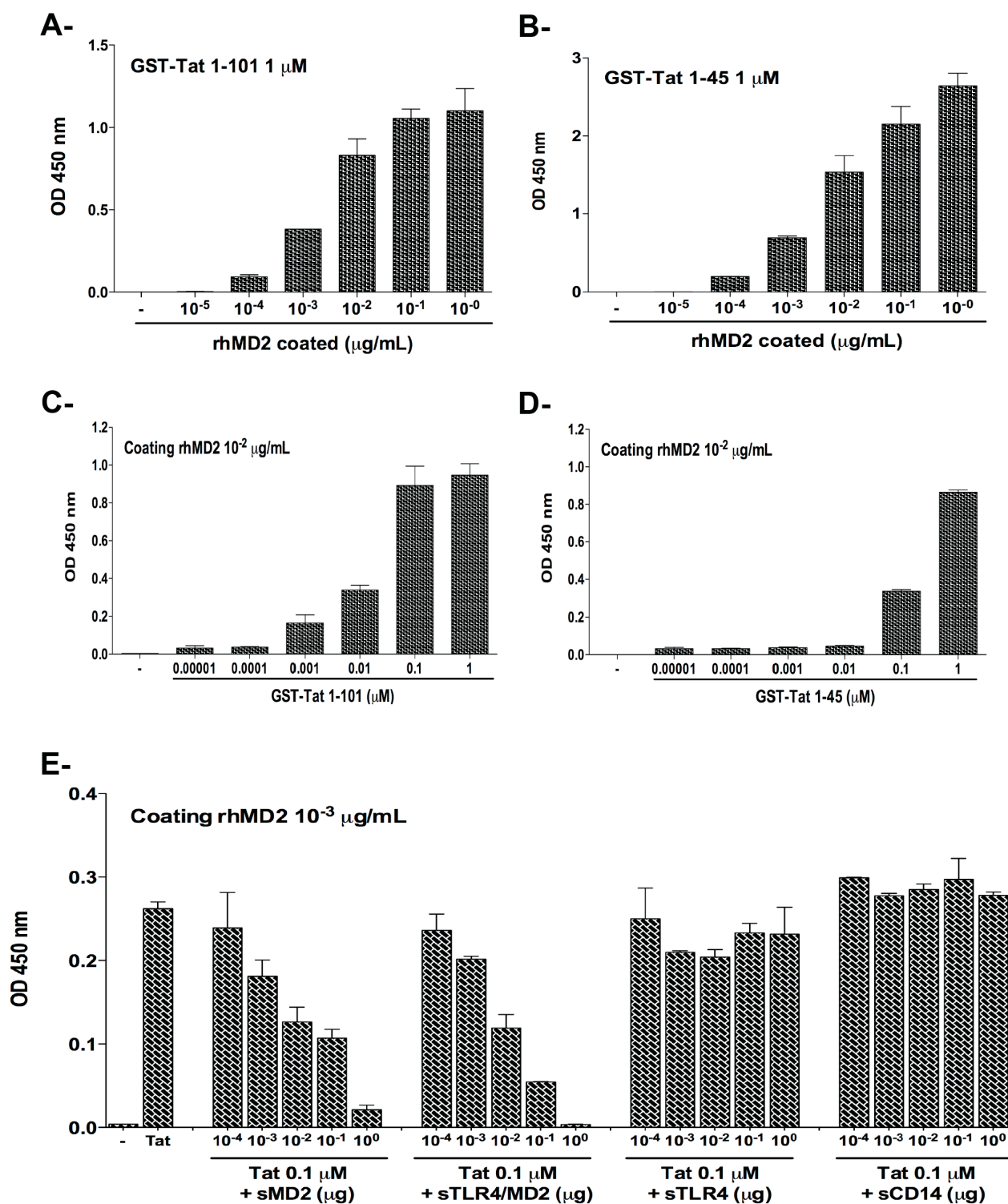
Figure 4.

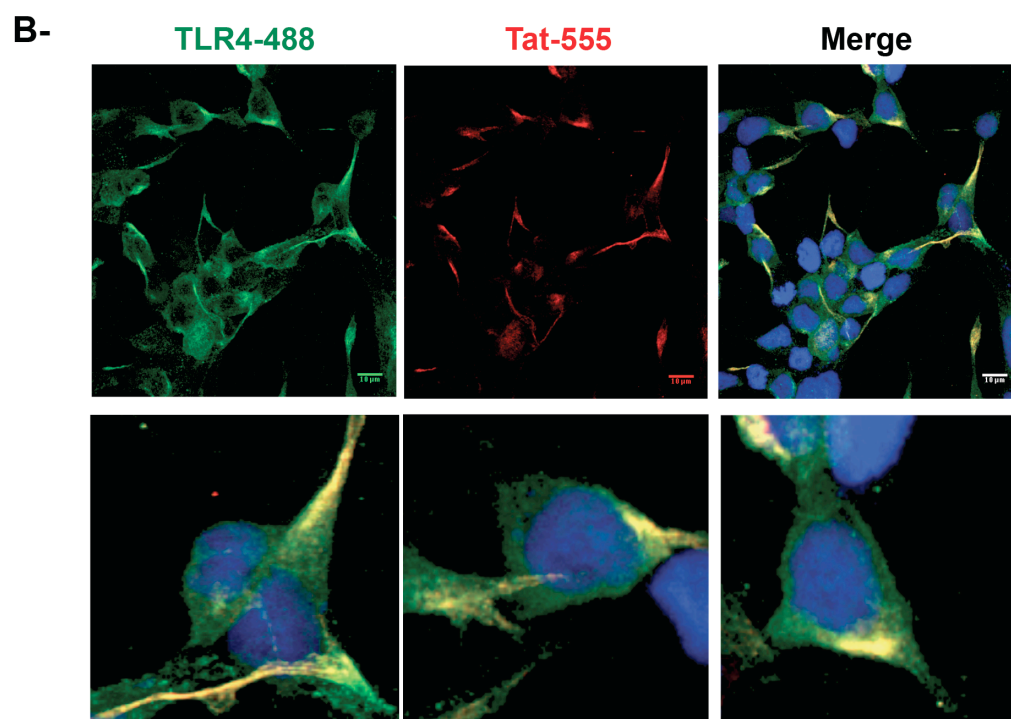
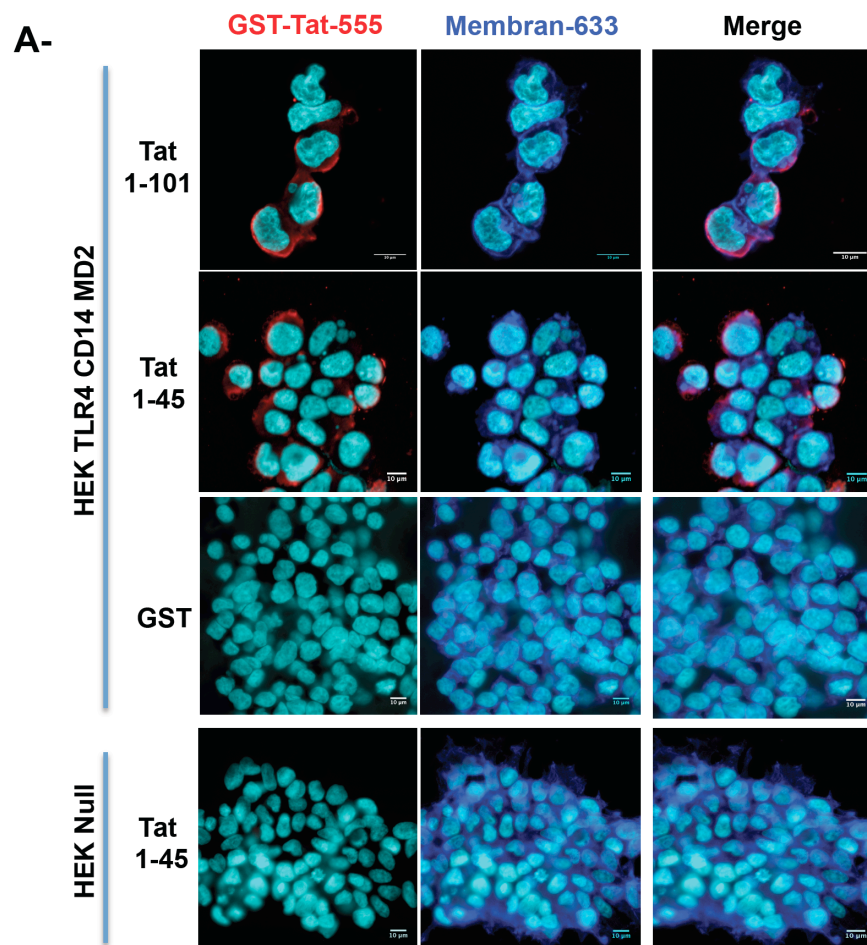
Figure 5.

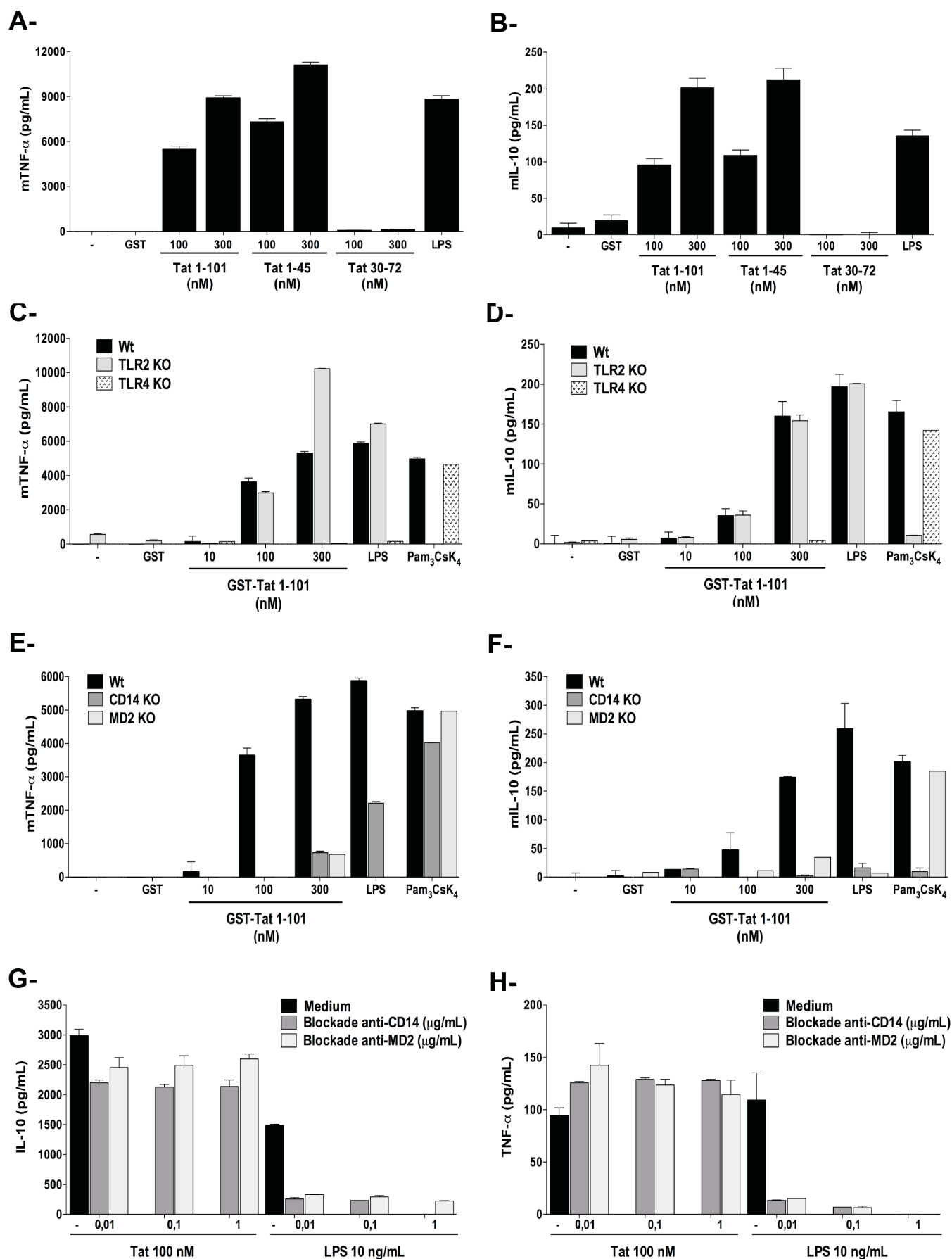
Figure 6.

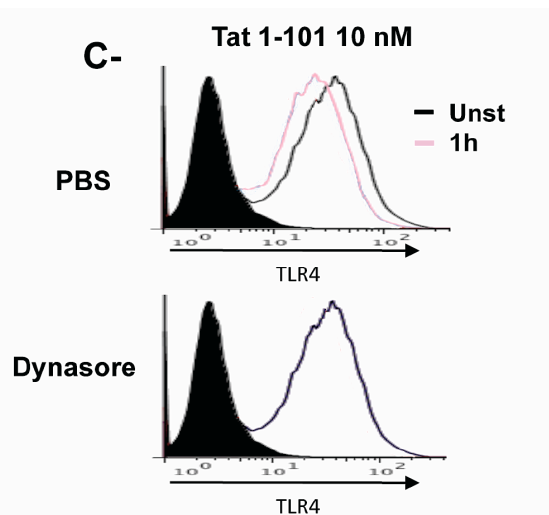
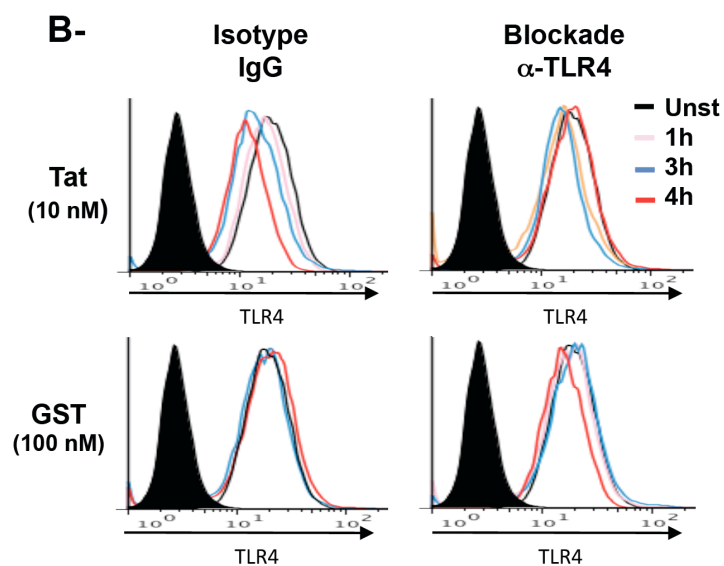
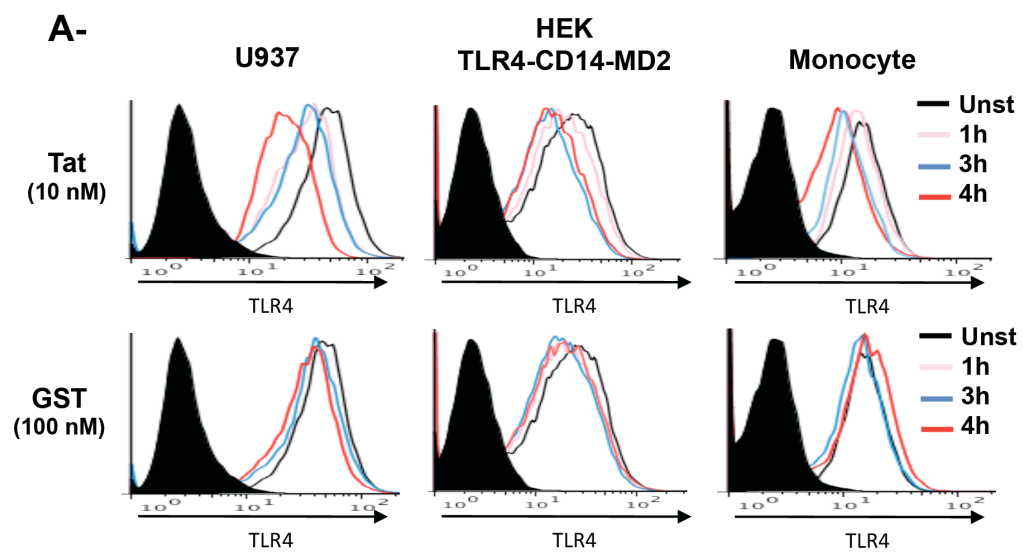
Figure 7.

Figure 8.

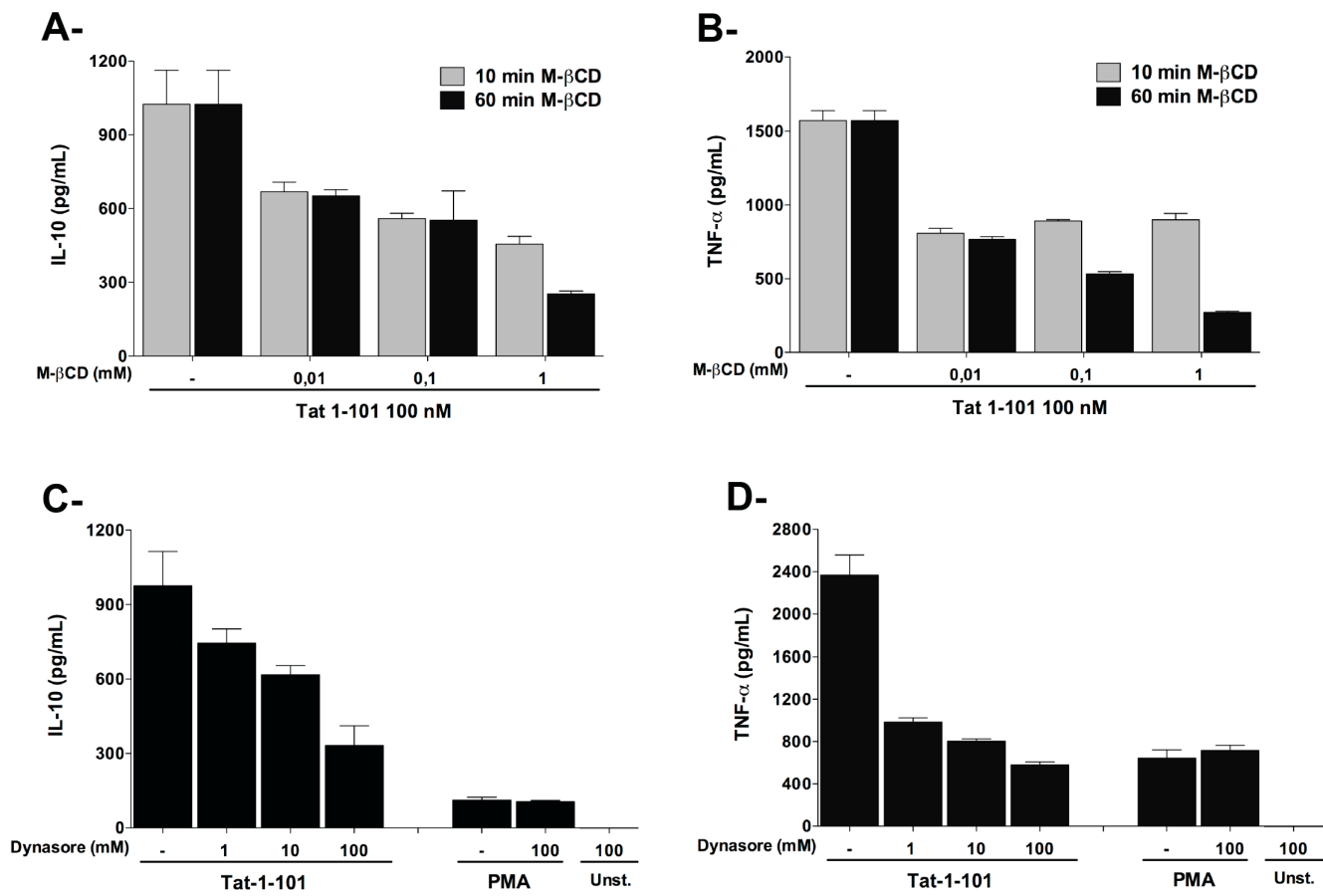
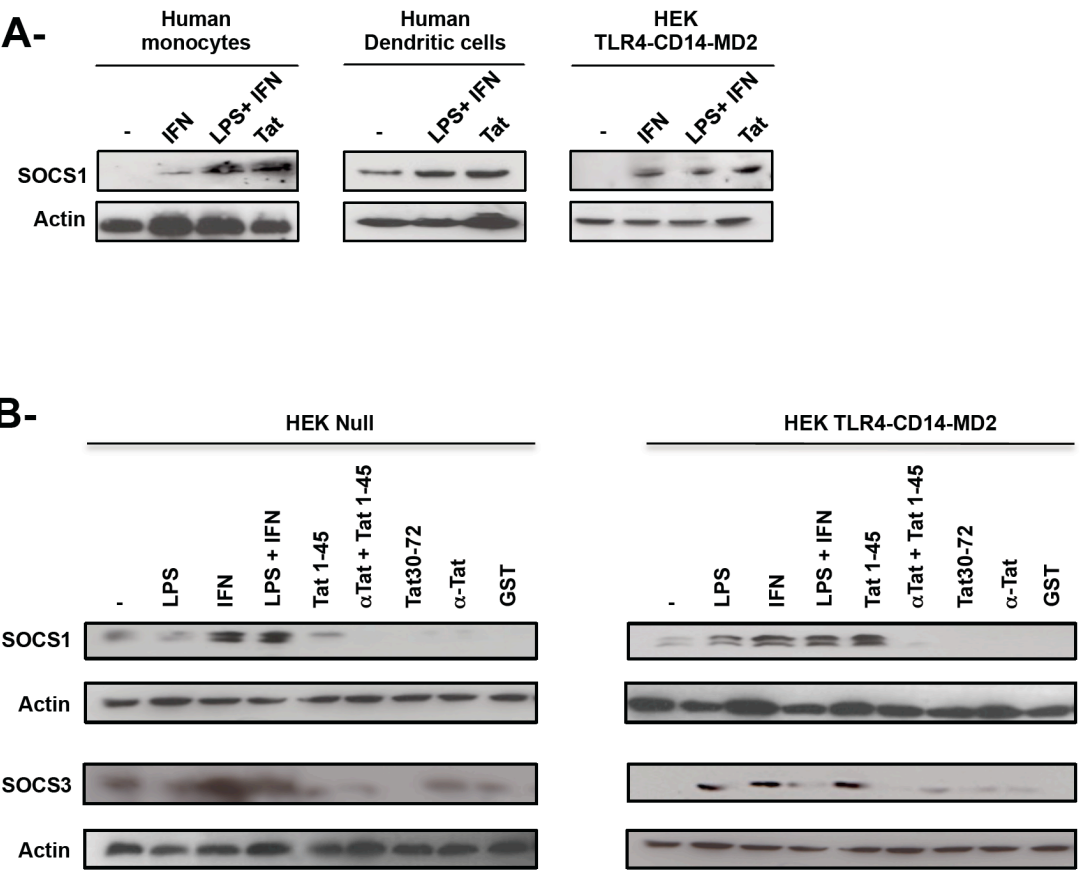
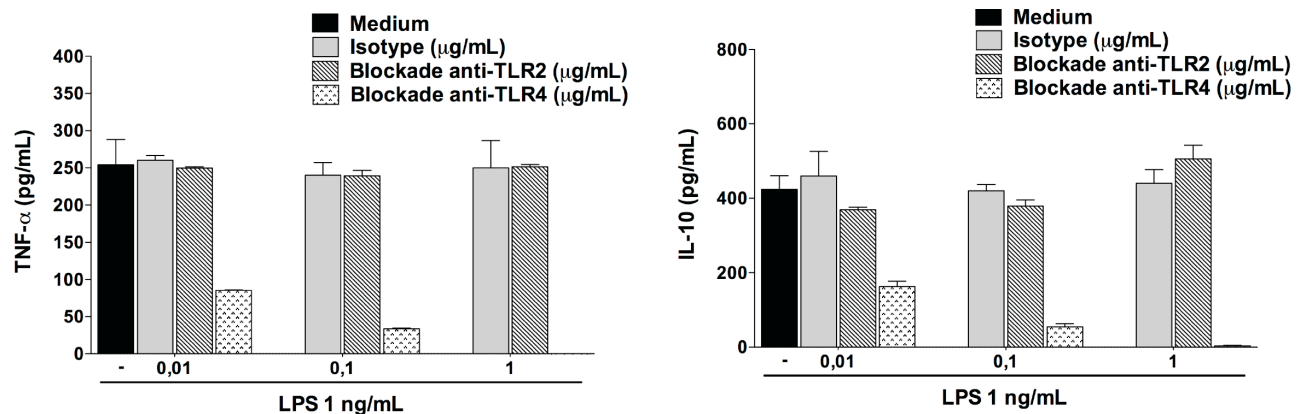


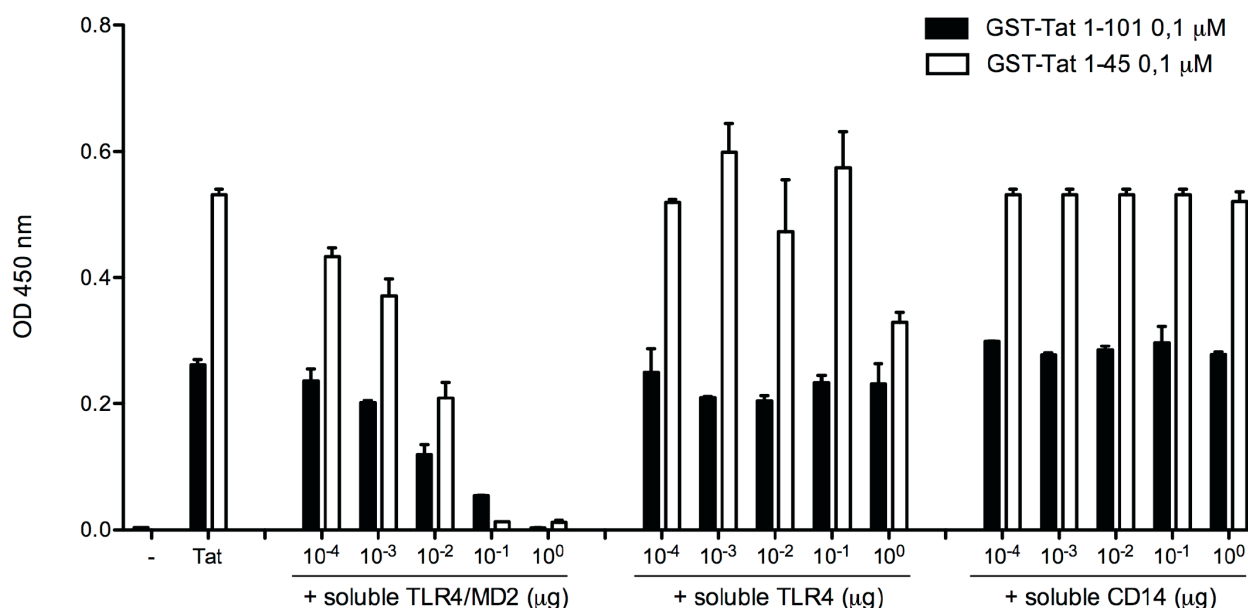
Figure 9.



Supplementary data I

Figure 10.**Figure 10. LPS-induced TNF α and IL-10 is TLR4-dependent.**

Monocytes were pretreated or not with increasing amounts of blocking antibodies against TLR4 or TLR2 or isotype control for 1h before stimulation by LPS 1 ng/mL. cytokines production was quantified in the culture supernatant by ELISA. Data represent means \pm SD (n=3).

Figure 11.**Figure 11. Tat interacts specifically and with high affinity with MD2 and TLR4-MD2.**

rhMD2 and rhTLR4-MD2 compete for Tat-rhMD2 interaction: GST-Tat 1-101 and 1-45 (0.1 μM) were pre-incubated for 1 h with PBS (control) or with increasing amounts of soluble rhMD2, rhTLR4-MD2 or rhCD14 before incubation with the coated rhMD2. Binding of Tat to rhMD2 was analyzed as described above by measuring OD at 450 nm. Data represent mean \pm SD (n \geq 3).

Figure 12.

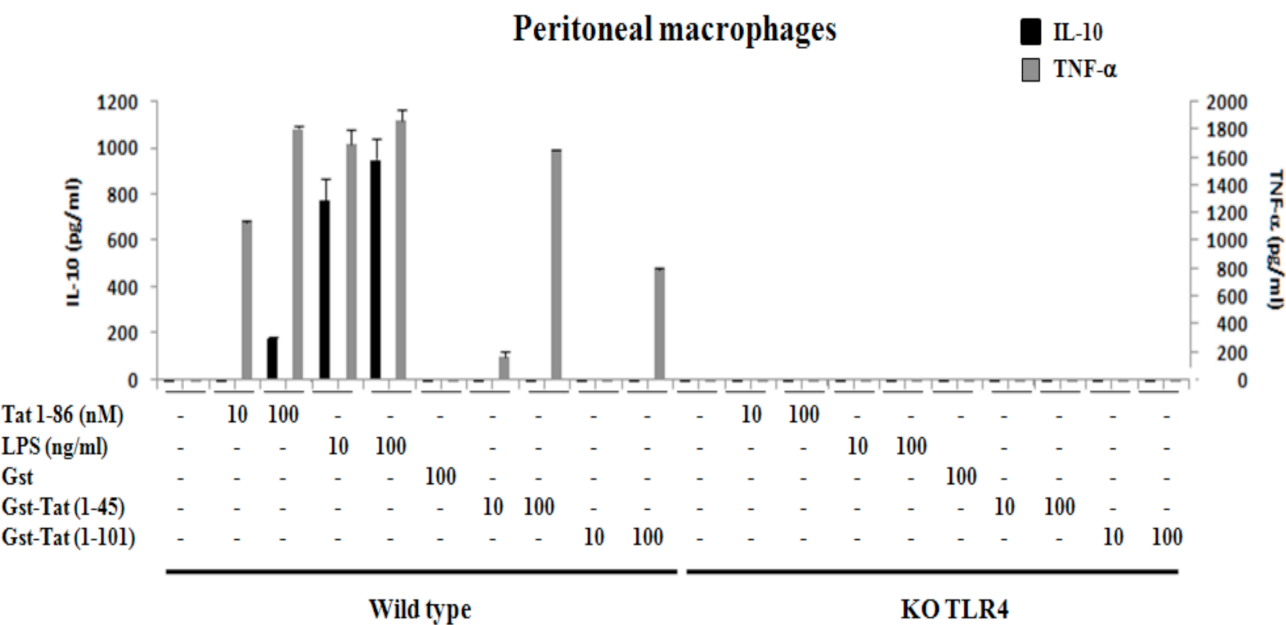


Figure 12. Tat protein fails to stimulate TNF- α and IL-10 in macrophages from TLR4^{-/-} MD2^{-/-}, and CD14^{-/-} mice.

Macrophages were isolated from Wt mice (CH3HeJ) or mice deficient for TLR4 signaling (CH3HeN). The cells were stimulated with increasing concentrations of Tat 1-86, GST-Tat 1-101, GST-Tat 1-45, GST as control or LPS. Mouse TNF- α and IL-10 production were determined by ELISA. Data representative of three independent experiments (mean +/- SD).

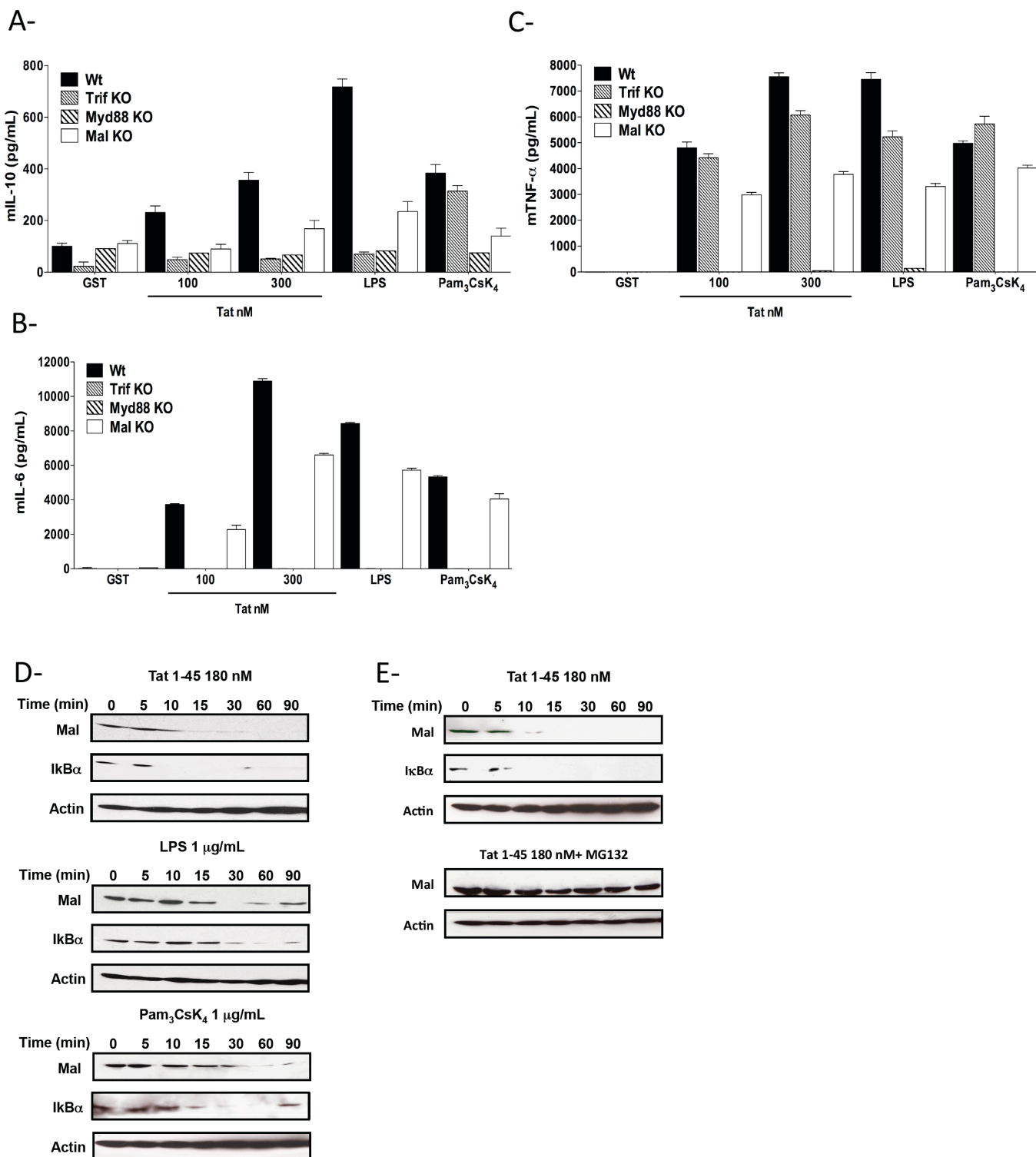
Figure 13.

Figure 13. HIV-1 Tat uses Myd88 and TRIF signaling pathways to induce cytokines production.

A-C) Peritoneal macrophages (5×10^5 /well) from wild type C57BL/6 or MyD88, Mal or TRIF deficient mice were stimulated for 24 h with total Tat protein. Positive control experiments were performed by using the following TLR ligands: LPS (TLR4-CD14-MD2) and Pam₃CsK₄ (TLR2-CD14). Mouse IL-6, TNF- α and IL-10 production were determined by ELISA. The data represent means \pm SD of three independent experiments.

D) THP-1 promonocytic cells (10^6) were stimulated (time, top lanes) with Tat 1-45 180 nM, lysed and equal protein concentrations were analyzed for Mal degradation by western blot using polyclonal antibody against Mal. Activation of TLR pathways was verified by immunoblotting for I κ B degradation. As controls same experiments were done with LPS and Pam₃CsK₄ (1 μ g/mL).

E) THP-1 cells were pretreated with 20 μ M of the 26S proteasome inhibitor MG132 before stimulation with Tat for the indicated amounts of time. Lysates were assayed for Mal degradation as described above.

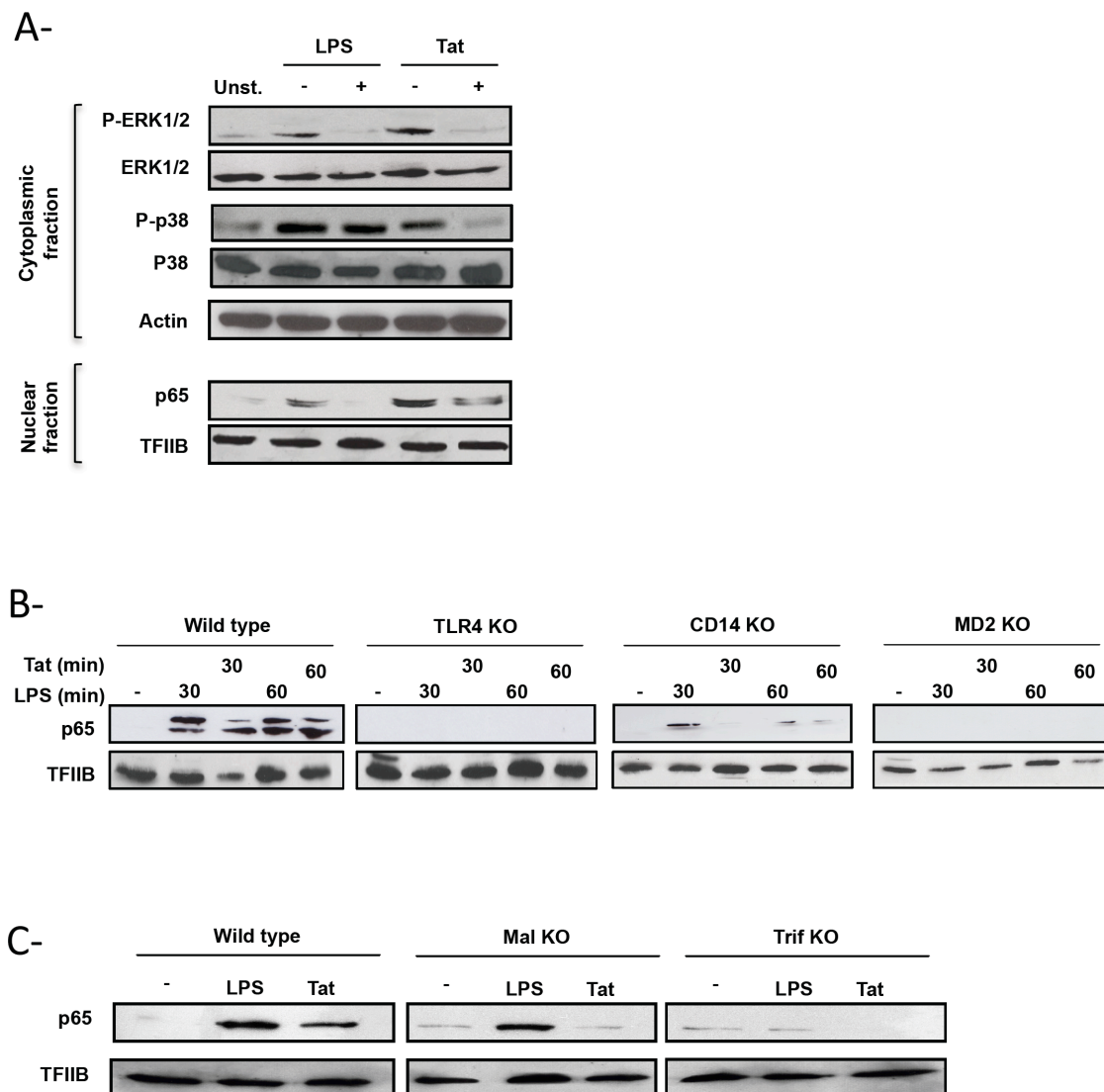
Figure 14.

Figure 14. TLR4 and its signaling pathways, MyD88 and TRIF, are implicated in MAPkinases and p65 activation by HIV-1 Tat.

A) Monocytes (10^6) pretreated 1h with blockade anti-TLR4 (1 μ g/ml) were stimulated by Tat or LPS for 30 min. Cytoplasmic and nuclear extracts were analyzed by western blot using specific antibodies for total and phosphorylated form of ERK1/2 and p38 MAPkinases or p65 subunit of NF- κ B. Cytoplasmic and nuclear fractions were normalized with total actin and TFIIB proteins respectively. **B)** Wt, TLR4, CD14, MD2 or **C)** Mal and TRIF KO macrophages mice ($5 \cdot 10^5$) were stimulated or not with Tat (100 nM) or LPS (10 ng/mL). After 30 or 60 min of stimulation, cells were lysed and nuclear extracts were obtained and tested for NF- κ B/p65 activation by western blot using specific antibodies. For loading control and normalization we used TFIIB proteins.

Supplementary data II

La protéine Tat du VIH-1 induit la production de l'IL-6 et l'IL-8 de manière TLR4-CD14-MD2 dépendante.

Résumé

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une activation chronique du système immunitaire. Cette dernière aboutit à des troubles neurologiques menant à la démence et à la prolifération anarchique de nombreuses cellules entraînant le développement de cancers tels que le sarcome de Kaposi. Ces effets sont principalement médiés par la production de cytokines et chimiokines, dont l'IL-6 et l'IL-8.

Dans ce travail, nous avons tenté de définir le facteur viral impliqué dans cette production de cytokines/chimiokines. Nous avons montré que c'est la protéine Tat du VIH-1 qui agit à la membrane des monocytes/macrophages pour induire la production de l'IL-6 et de l'IL-8. Etant donné les résultats de nos précédents travaux, nous avons testé l'implication du complexe TLR4-CD14-MD2 dans la production d'IL-6 et d'IL-8 par Tat. Ainsi, nous avons montré qu'en bloquant l'activation du TLR4, Tat perd sa capacité à induire la production d'IL-6 et d'IL-8. Ces résultats ont été confirmés dans le model murins et dans les lignées HEK transfectées ou non avec le TLR4. De façon intéressante, nous avons aussi montré que lorsque le TLR4 est absent (macrophages KO ou lignées HEK) ou bloqué (anticorps bloquants, siRNA ou dominants négatifs), l'activation de NF- κ B, nécessaire à la synthèse de l'IL-6 et de l'IL-8 induite par Tat, est totalement inhibée. Ces résultats suggèrent que NF- κ B est activé en aval du TLR4 pour la synthèse de cytokines. Nos résultats indiquent que Tat active le TLR4 et NF- κ B pour induire la production d'IL-6 et d'IL-8. De plus, nos données montrent que la stimulation des cellules par Tat provoque l'internalisation et la régulation du TLR4.

Ces résultats montrent que Tat, par son domaine N-terminal, interagit avec le complexe TLR4-MD2 sur les monocytes/macrophages pour produire l'IL-6 et l'IL-8. Ces cytokines/chimiokines sont impliquées dans la dérégulation du système immunitaire et la progression de la maladie vers la phase SIDA. Cette étude suggère un nouveau mécanisme permettant au virus l'établissement de l'infection et pourrait contribuer à la compréhension des mécanismes mis en place par le VIH-1 pour induire la pathogénèse associée l'infection.

Figure 1

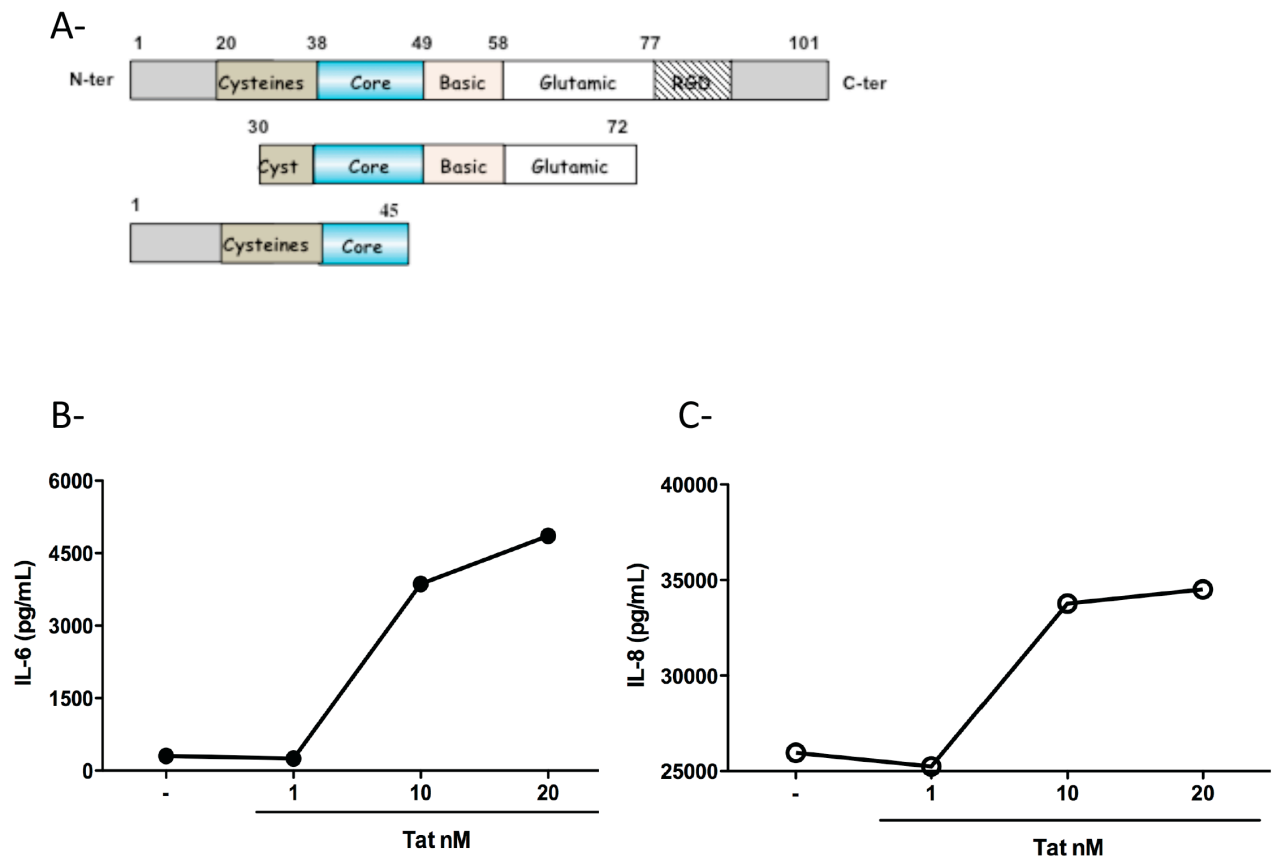


Figure 1. HIV-1 Tat induce IL-6 and IL-8 production in monocytes/macrophages. **A)** Structure of total Tat and its deleted mutants, GST-Tat 1-45 and GST-Tat 30-72. **B)** Monocytes or **(C)** Wt mouse macrophages were incubated with increasing amount of total Tat protein. After 24 h of stimulation, human or mouse IL-6 and IL-8 production were measured in culture supernatants by ELISA. Cytokine production is expressed in pg/ml. The data represent means and standard deviation (SD) of three independent experiments.

Figure 2

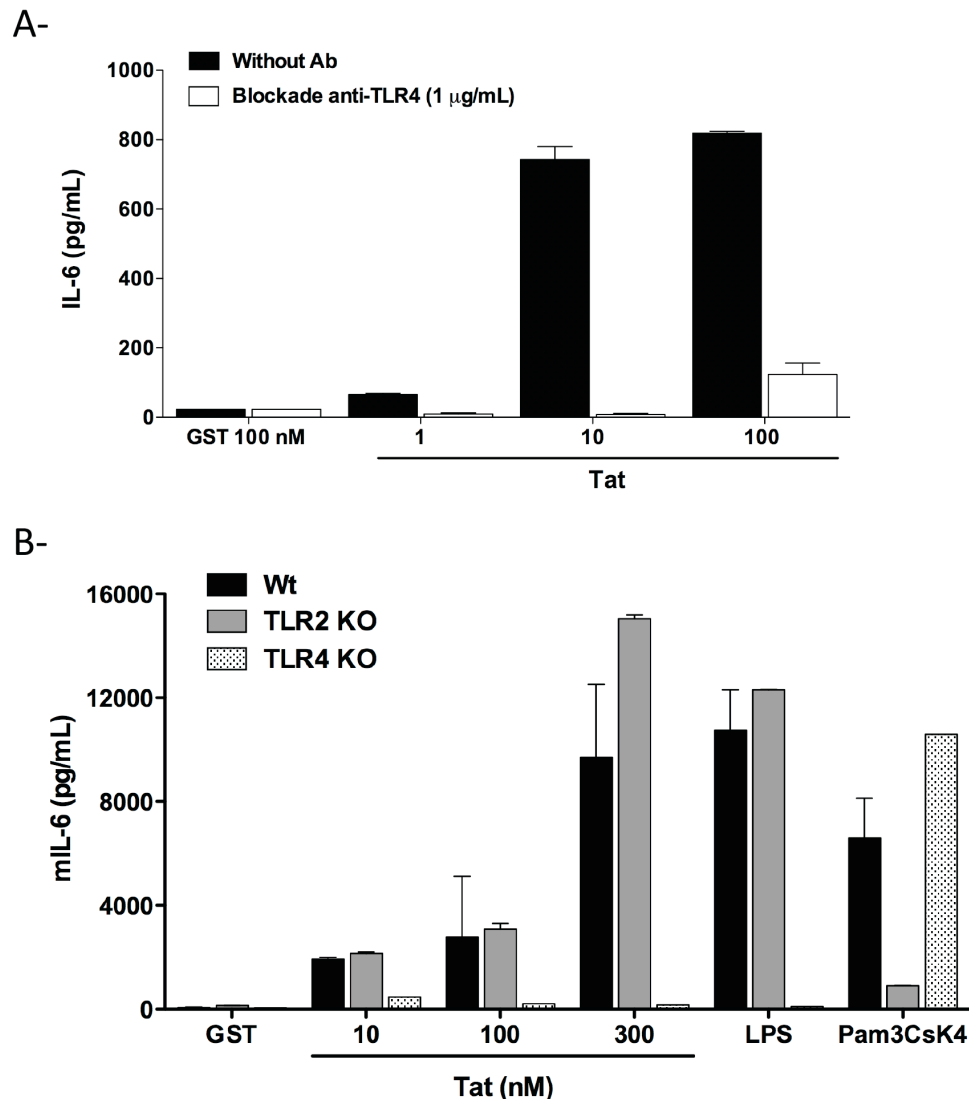


Figure 2. HIV-1 Tat induce TLR4 dependent production of IL-6 and IL-8 production by TLR4-CD14-MD2 dependent manner. **A)** Human monocytes were pretreated or not 1h, with 1 µg/ml of blocking antibodies against TLR4, before stimulation by increasing amount of total Tat. Culture supernatants were recovered after 24 h and IL-6 production was measured by ELISA. **B)** Peritoneal macrophages (5.10^5 /well) from wild type C57BL/6 or from TLR2 or TLR4 KO mice were stimulated for 24 h with increasing concentration of total Tat protein. Control experiments were performed by using the following TLR ligands: LPS (TLR4-CD14-MD2) and Pam₃CsK₄ (TLR2-CD14). Mouse IL-6 production was determined by ELISA. The data represent means \pm SD of three independent experiments.

Figure 3

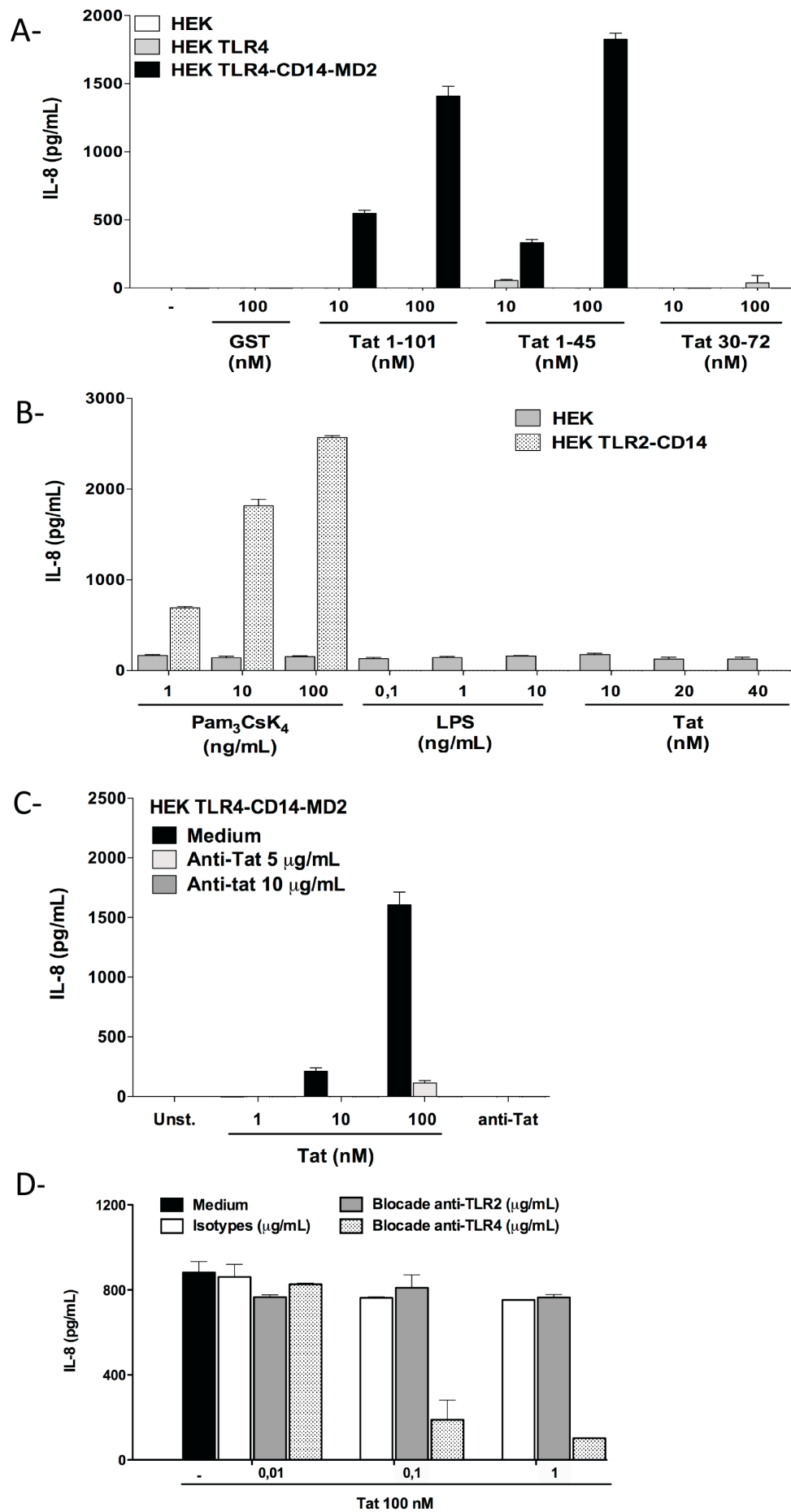
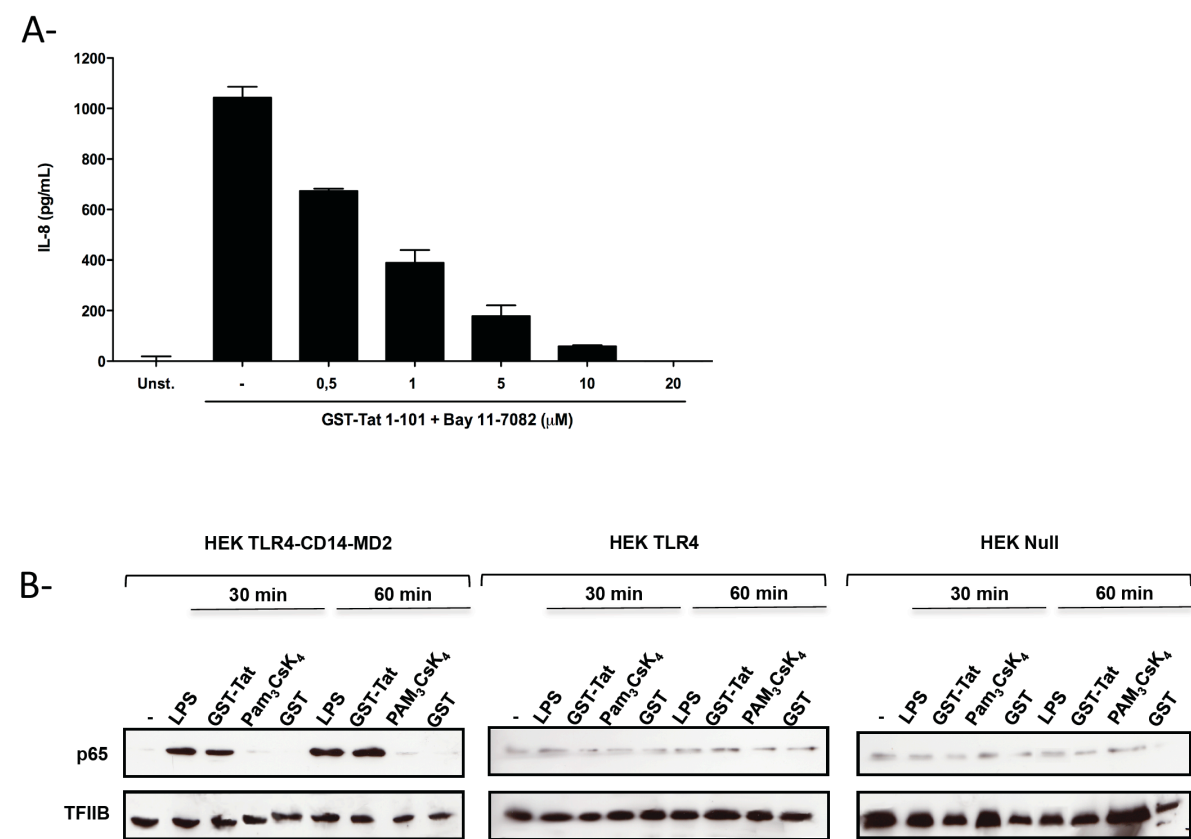


Figure 3. HIV-1 Tat induce of IL-6 and IL-8 production by a TLR4-CD14-MD2 dependent manner. **A)** HEK cell lines expressing TLR4 or TLR4-CD14-MD2 proteins were pretreated or not with 10 and 100 nM of GST-Tat 1-101 or its deleted mutants 1-45 or 30-72. For control experiments, HEK Null cells were used in the same conditions. The data represent means \pm SD of three independent experiments. **B)** HEK Null or HEK cell expressing TLR2-CD14 were pretreated or not with indicated amounts of total Tat or LPS or Pam₃CsK₄. After 24h, IL-8 production in culture supernatant was analyzed by ELISA. The data represent means \pm SD of three independent experiments. **C)** HEK-TLR4-CD14-MD2 cells were stimulated with GST-Tat 1-101 or mutant 1-45 previously incubated with 5 μ g/mL of anti-Tat blocking antibodies. After 24h of stimulation, IL-8 production induced by Tat was quantified in the culture supernatant by ELISA. The data represent means \pm SD of three independent experiments. **D)** HEK-TLR4-CD14-MD2 cells were previously treated with increasing amounts of Mab anti-TLR4 or anti-TLR2 or isotypes control for 60 min before stimulation with Tat. After 24h, IL-8 production was measured in the culture supernatants by ELISA. The results are expressed in pg/ml. The values are representative of at least three independent experiments.

Figure 4



Revue 1.

HIV-HOST INTERACTIONS

Edited by **Theresa L. Chang**

INTECHWEB.ORG

HIV-Host Interactions

Edited by Theresa L. Chang

Published by InTech

Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia

Copyright © 2011 InTech

All chapters are Open Access distributed under the Creative Commons Attribution 3.0 license, which permits to copy, distribute, transmit, and adapt the work in any medium, so long as the original work is properly cited. After this work has been published by InTech, authors have the right to republish it, in whole or part, in any publication of which they are the author, and to make other personal use of the work. Any republication, referencing or personal use of the work must explicitly identify the original source.

As for readers, this license allows users to download, copy and build upon published chapters even for commercial purposes, as long as the author and publisher are properly credited, which ensures maximum dissemination and a wider impact of our publications.

Notice

Statements and opinions expressed in the chapters are these of the individual contributors and not necessarily those of the editors or publisher. No responsibility is accepted for the accuracy of information contained in the published chapters. The publisher assumes no responsibility for any damage or injury to persons or property arising out of the use of any materials, instructions, methods or ideas contained in the book.

Publishing Process Manager Silvia Vlase

Technical Editor Teodora Smiljanic

Cover Designer Jan Hyrat

Image Copyright sgame, 2011. Used under license from Shutterstock.com

First published October, 2011

Printed in Croatia

A free online edition of this book is available at www.intechopen.com

Additional hard copies can be obtained from orders@intechweb.org

HIV-Host Interactions, Edited by Theresa L. Chang

p. cm.

978-953-307-442-9

INTECH OPEN ACCESS
PUBLISHER

INTECH open

free online editions of InTech
Books and Journals can be found at
www.intechopen.com

HIV Infection «HIV Tat Protein, a Key Factor in Pathogenesis and Immune System Dysregulation: Implication of IL-10»

Ben Haij N., Planès R., Mzoughi O. and Bahraoui E.
*Université Paul Sabatier, Unité mixte INSERM/CNRS/UPS 1043, Toulouse
 France*

1. Introduction

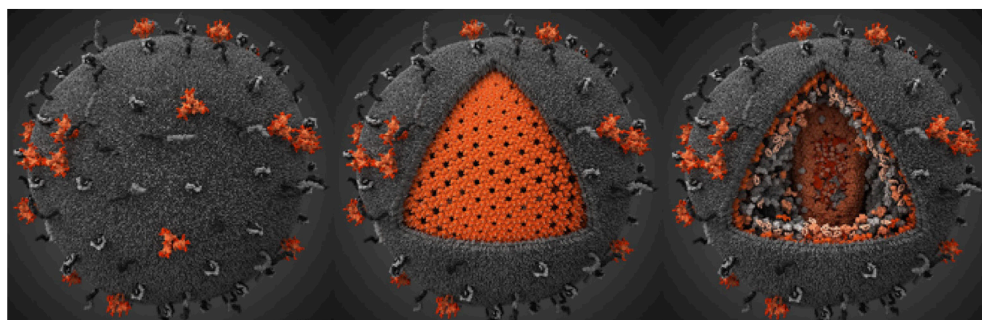
Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the causative agent of AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Currently, the infection by HIV is considered as one of the major problem of public health and social stability. The scale of HIV/AIDS epidemic has exceeded all expectations since its identification 30 years ago. Currently, according to the report on HIV/AIDS by UNAIDS and World Health Organization (WHO) in 2009, we estimated approximately 33 million people are currently living with HIV-1 and about 25 millions have already died (Piot, Feachem et al. 2004). HIV infection leads to a decline in the number of T helper CD4 cells leading to a progressive dysfunction of the immune system. This weakening of the immune system results in the development of opportunistic infections leading to death of the patient. Despite prevention policies and anti-retroviral therapies, AIDS still remains one of the most serious humanitarian crises that we have never known.

1.1 HIV taxonomy, structure and genome organization

Identified in 1983, HIV belongs to lentivirus genus of Retroviridae (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983). Lentiviruses are host-specific viruses which cause slowly progressive diseases in their hosts and are characterized by selective T CD4 depletion (Fauci 1988) associated with a severe immunological and neurological disorders. These disorders are amplified by the fact that the virus infects the key cells of the immune system. As consequences, immunological disorders in HIV infected patients are observed since the asymptomatic stage. Two major subtypes of HIV have been identified: HIV-1 and HIV-2 (Clavel, Guetard et al. 1986). The first, HIV-1, is world wide, virulent and responsible of HIV infection globally. However, the second, HIV-2, is less pathogenic and is largely confined to West Africa. These two types of virus share a 40% homology in their sequences. HIV-1 strain is subdivided into three genetically groups: M (Major), N (New or non M non O) and O (Outlier) (Clavel, Guetard et al. 1986). The M strain is the most spread worldwide, it represents more than 95% of the global virus isolates. The variability within the sequence of *env* gene of HIV-1, allowed it to be subdivided into 10 clades A to L (McCutchan 2000). At least 15 additional circulating recombinant forms (CRF) has been identified in HIV-1 patients living in different geographic regions of the world (Peeters and Sharp 2000). However, the presence of these CRF seems to be more present in Africa, Asia and South of America. Despite the high sequence homology between HIV-1 and HIV-2 and the

existence of co-infection *in vivo* with the two viruses, no recombination between HIV-1 and -2 have been reported. About the question of the origin of HIV-1 and HIV-2 transmission to human, it is admitted that it comes respectively from a cross-species of SIVcpz (Simian Immunodeficiency Virus which infects chimpanzees) in Central Africa and SIVsm (Simian Immunodeficiency Virus which infects sooty mangabey) in West Africa (Hirsch, Olmsted et al. 1989; Gao, Gorelick et al. 2003).

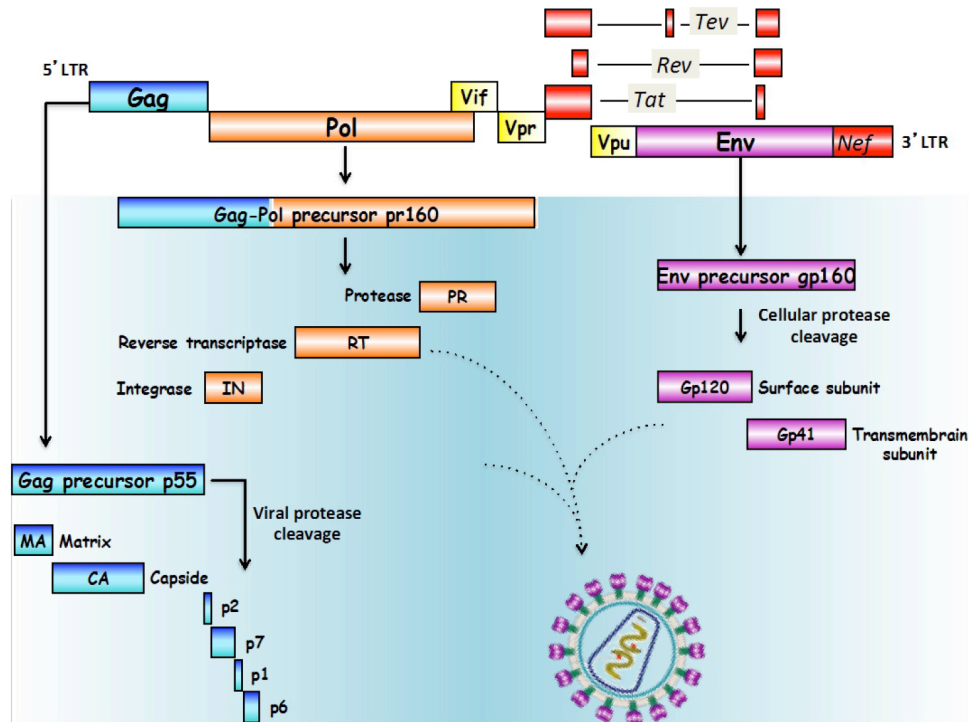
HIV-1 is an enveloped virus. The viral particles are produced as immature virions by budding from infected cells. After maturation by the viral protease, mature particles adopt spherical forms with a diameter of 90-100 nm (figure 1).



This spatial representation takes into account and summarizes the results from more than 100 latest scientific publications in the fields of virology, X-ray analysis and NMR spectroscopy. The depicted spatial configurations of 17 different viral and cellular proteins found in HIV particle are in strict accordance with known 3D-structures. This model of HIV virion is put on the cover of the special issue of Nature Medicine (September 8, 2010) prepared by the Global HIV Vaccine Enterprise.

Fig. 1. Model reconstitution of spatial structure of HIV-1.

Those mature particles have a cone shaped core composed of the p24 viral protein. It was estimated that each viral particle contains 1500-2000 Gag and 100-200 Pol molecules. The envelope glycoproteins are present as trimers of gp120/gp41 and were estimated to ten trimers per particle. The HIV capsid contains the viral genome composed of two identical single stranded RNA molecules allowing the establishment of frequent genetic changes by recombination. The RNA viral genome is capped at its 5'-end and polyadenylated at its 3'-end. The viral reverse transcriptase, integrase and nucleoproteins were found associated with the viral genome. The HIV genome of approximately 10kb encodes for 16 distinct proteins (Sodroski, Rosen et al. 1985). A schematic representation of HIV genome and proteins is illustrated in figure 2. As in all retroviruses, those proteins are derived from three essential genes *gag*, *pol* and *env*. The first gene *gag* encodes for Gag precursor p55, which is cleaved by viral protease to give capsid, matrix and nucleocapsid proteins : p24, p17, p7 and p6. Enzymatic proteins are encoded by *pol* gene and give three viral enzymes : protease p11, transcriptase reverse p65/51 and integrase p32. The *env* gene encodes for the precursor gp160 which is later proteotically cleaved by a cellular protease into the two envelope proteins gp120 and gp41. These steps of maturation by the viral or the cellular proteases are crucial for the production of infectious viral particles. In addition to these structural and enzymatic gene products, HIV genome encodes for two regulatory proteins Tat (transcriptional transactivator) and Rev (regulator of virion gene expression) and also for four accessory proteins : Vif (viral infectivity factor), Vpr (viral protein r), Vpu (viral protein



Gag (group specific antigen) and Gag-Pol (polymerase) are polyprotein precursors that are processed by viral protease. The 9 mature subunits are protease (PR), reverse transcriptase (RT), integrase (IN), matrix (MA), capsid (CA), p2, nucleocapsid (NC), p1 and p6. Envelope is also cleaved, however by a host cellular protease into surface (SU) gp120 and transmembrane gp41 moieties. HIV genome encodes also for accessory and regulatory proteins: transcriptional transactivator (Tat), regulator of virion gene expression (Said, Dupuy et al.), viral infectivity factor (Vif), viral proteins u (Vpu), viral proteins r (Vpr) and negative factor (Nef). *Tev* contains Tat, Env and Rev sequences and functions like Tat and Rev.

Fig. 2. HIV genome organization and proteins.

u) and Nef (negatif factor) (Emerman and Malim 1998). The gene products of *rev* and *tat* are produced early in the viral cycle and their expression is essential for the viral replication. Deletion of one of them leads to an abortive viral cycle. The Tat protein is implicated in the initiation and elongation/stabilisation of transcribed viral mRNA. Tat binds to a specific site called TAR (Tat responsive region) located in the LTR. Tat is the major protein involved in the upregulation of HIV-1 replication. In parallel, the Rev protein interacts with a structure called RRE (Rev responsive element) located in the *env* gene (Emerman and Malim 1998). This interaction permits mono and unspliced mRNA to cross the nuclear membrane in order to enter in the cytoplasm, where, they will be translated to proteins or encapsidated in the nascent viral particles. As Tat and Rev, Nef is also an early produced protein. This protein has at least three distinct activities including down regulation of cell surface CD4 and MHC class I molecules and enhancement of virion infectivity. It has been reported that this protein is essential for proviral DNA synthesis. It is also important for cell-cell transmission of the virus. In fact, the Vif protein seems to be involved in the final stages of the nucleoprotein

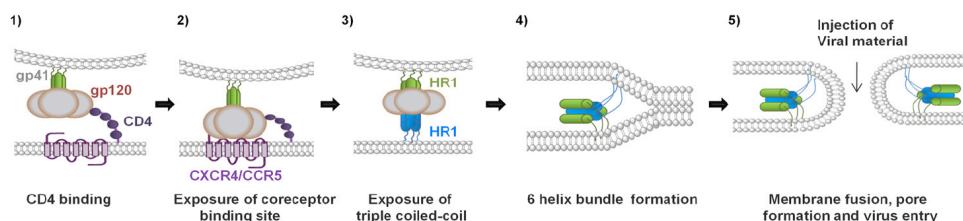
core packaging (Peterlin and Trono 2003). The Vpr protein affects the nuclear localization of viral nucleic acids in non dividing cells and induces cell differentiation (Peterlin and Trono 2003), while the Vpu protein enhances virion release and degrades CD4 in the endoplasmic reticulum (Hoglund, Ohagen et al. 1994). Many studies have put forward that Vpr, Vif, Nef and perhaps Tat are found associated in the viral particles.

1.2 HIV-1 tropism and replication cycle

At least 11 distinct steps can be identified in HIV-1 viral cycle including: viral attachment, entry by fusion and uncoating, reverse transcription of the RNA genome by reverse transcriptase to double stranded DNA (dsDNA), nuclear translocation of the pre-integration complex, integration of the proviral dsDNA, transcription of the proviral genome after cellular activation, splicing and nuclear transport of mono and unspliced RNA, translation of the viral RNA, assembly and packaging of the genomic RNA, budding to give immature viral particles and maturation to give infectious viral particles. Since the infection are mediated through the bodily fluids, HIV infects specially CD4 positive cells and essentially T-CD4 helper cells, monocyte/macrophage and dendritic cells (DC) (Dalglish, Beverley et al. 1984). The virus enters cells by fusion and endocytosis (Chambers, Pringle et al. 1990; Bernstein, Tucker et al. 1995). Productive infection of target cells is initiated by the binding of the external envelope glycoprotein gp120 to CD4 receptor on the cell surface membrane (Bour, Geleziunas et al. 1995). At the surface of the virus the trimer of gp120 is associated with three molecules of the transmembrane gp41 by non-covalent interactions. CD4-gp120 interaction is mediated by conserved domains of gp120 and the first domain of CD4 receptor. Different reports have shown that gp120 interacts with CD4 with high affinity with dissociation constant of nanomolar level (Fenouillet, Clerget-Raslain et al. 1989). It is interesting to note that the conserved domains of gp120 appear to be few or non-immunogenic in HIV-1 infected patients. Generation antibodies against the conserved domains of gp120 are of great interest. In fact, despite the great variability observed in HIV-1 sequence, all viruses recognize the same receptor CD4. Thus, the production of such antibodies will probably exhibit a large spectrum of HIV neutralization by blocking gp120-CD4 interaction with all HIV-1 subtypes despite their variability. A great number of studies are working to design potential vaccine candidates based on these conserved domains of HIV-1 envelope glycoproteins. Entry of HIV requires also an interaction of gp120 with a coreceptor: CCR5 (R5 tropic virus) and/or CXCR4 (X4 tropic virus) (Maddon, Dalglish et al. 1986; Kozak, Platt et al. 1997; Platt, Wehrly et al. 1998). At the time of primo-infection, HIV recognizes and infects principally cells that express CCR5 proteins (monocytes/macrophages) (Dragic, Litwin et al. 1996). With time the virus switch from R5 to X4 tropic to infects T cells (Grivel and Margolis 1999; Shankarappa, Margolick et al. 1999). This tropic evolution correlates with late stage of HIV infection: AIDS stage. Thus, interaction of gp120 to CD4 receptor and coreceptors induces HIV entry by allowing viral and host cell membranes fusion. This mechanism continues to be largely investigated at a molecular level, by different groups. We will briefly summarize here the key steps.

Subsequently to gp120-CD4 interaction, conformational changes occurs firstly in the viral gp120 and then, in the transmembrane gp41. Modifications in gp120 structure contribute to the exposure of V3 region, which contains the binding site of the viral chemokine receptors CCR5 or CXCR4. This latter interaction mediates further modifications in the gp41 structure

leading to the exposition of the hydrophobic N-terminal gp41 fusion domain. Then the insertion of this fusion domain into the membrane of the host cell allows its fusion with the viral membrane (Chan, Fass et al. 1997) (figure 3).



The mechanism of HIV-1 entry can be summarized in the following model. After binding of gp120 to receptor and coreceptor (step 1-2), gp41 undergoes conformational changes leading to the exposure of the fusion peptide and the accessibility of trimeric HR1 and the hydrophobic N-terminal domain, which contains the fusogenic region, and the trimeric HR2 domains (step 3). Then, HR1 and HR2 interacts together forming a 6-helix bundle leading to the membrane fusion and virus entry (step 4-5). The triple stranded coiled-coil structure (step 3), which probably explains its low immunogenicity in human patients infected with HIV-1.

Fig. 3. Representation of the different steps from the viral-host interaction and the viral entry after membranes fusion.

The chemokine coreceptors CCR5 and CXCR4 of HIV are preferentially found in lipid rafts (Kozak, Heard et al. 2002). These cholesterol and sphingolipid-enriched microdomains in the plasma membrane mirror the optimal lipid bilayer of the virus and provide likely a better environment for membrane fusion (Chambers, Pringle et al. 1990; Chazal and Gerlier 2003). Several inhibitors including T20 (enfuvirtide) have been developed. T20 is a synthetic peptide of 36 amino acids which blocks HIV-1 entry by interfering with the formation of the six helix bundle formed following the interaction between the trimeric HR1 and HR2 domains of the transmembrane envelope glycoprotein gp41 (Kilby, Hopkins et al. 1998). More recently a selective CCR5 antagonist, named maraviroc or vicriviroc has been developed. By blocking gp120-CCR5 interaction this antagonist present a potent anti-HIV-1 activity (Kromdijk, Huitema et al.; Perry). As T20, maraviroc is also active at nanomolar concentrations. It is postulated that CCR5 antagonists may be of great interest, if we consider that HIV-1 infection is essentially mediated by CCR5 tropic viruses (Kromdijk, Huitema et al.). The use of these type of entry inhibitors has been found to effectively inhibit infection of cells *in vitro* and *in vivo* by R5 strains tropic HIV-1 that have developed resistance to the other major classes of anti-retroviral drugs (anti reverse transcriptase and anti protease inhibitors). It is interesting to note that this is the first anti-HIV drug that targets the host cells rather than the virus directly. However, one potential limitation of such inhibitors is the possible selection and rapid emergence of CXCR4 tropic viruses. In fact, the isolation of HIV-1 from patients, who have never received an anti-retroviral therapy, naïve for HAART, showed the presence, of R5 tropic viruses in 85% of the cases. These results are in agreement with the natural resistance of persons harbouring CCR5delta32 deletion (Dean, Carrington et al. 1996; Huang, Paxton et al. 1996; Liu, Paxton et al. 1996; Samson, Libert et al. 1996). While the early stage of infection was characterized by the predominance of R5 tropic viruses, the emergence of viruses with CXCR4 tropism were associated with the late stage of

infection (Scarlatti, Tresoldi et al. 1997). The molecular basis of this R5 to CXCR4 switch remains to be clarified. CXCR4 strains seem to emerge only in 50% patients who develop AIDS (Connor, Sheridan et al. 1997; Scarlatti, Tresoldi et al. 1997). In addition to these two selective HIV-1 strains, an intermediate strain named dual tropic HIV-1 strain which use indifferently R5 and CXCR4 was also reported in some HIV-1 infected patients.

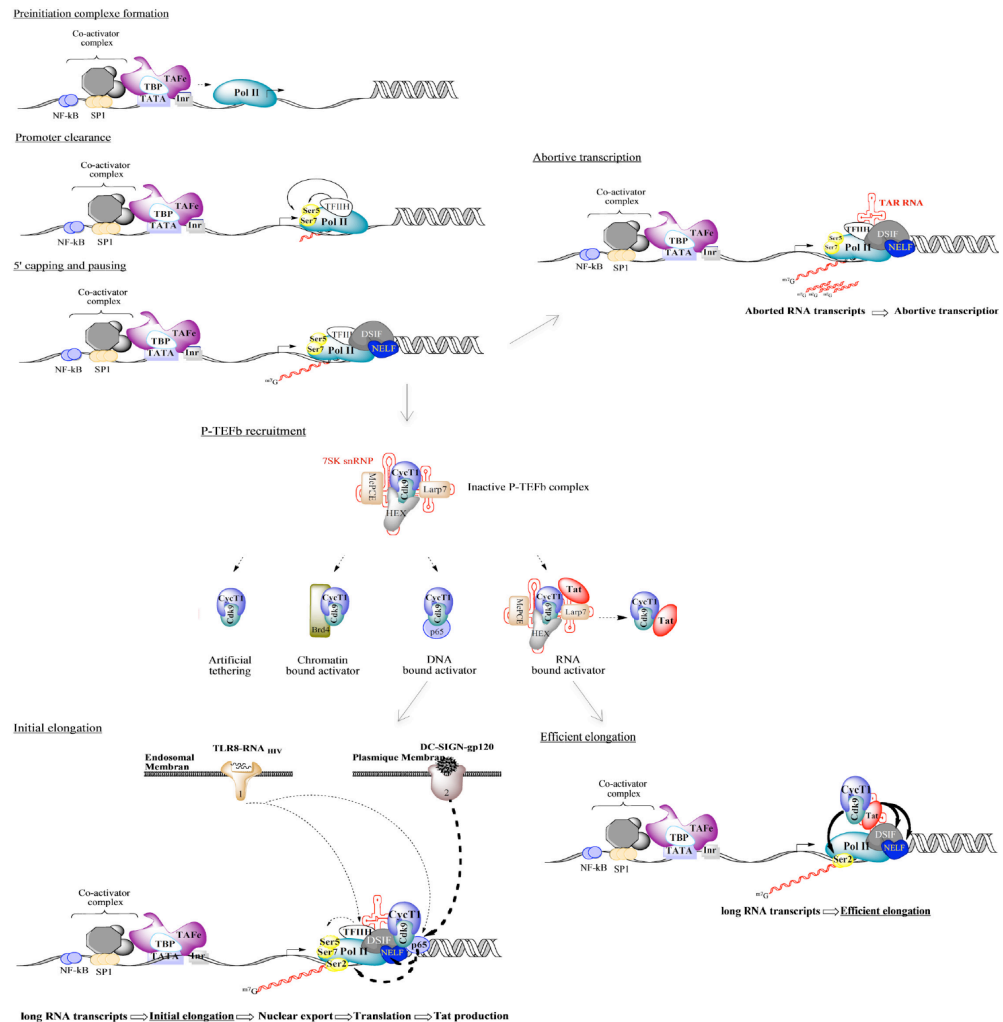
The external envelope gp120 is a highly glycosylated protein. Carbohydrates represent about 50% of its molecular weight (Fenouillet, Clerget-Raslain et al. 1989). The majority of these carbohydrates are of N-type glycosylation. O-glycosylation seems to be rarely present in HIV-1 envelope glycoproteins. Viruses use glycosylation as tool to escape immune responses, resist to protease degradation, and adopt structural native conformation or to bind cellular receptors. By its carbohydrate parts, envelope glycoprotein gp120 recognizes and interacts with high affinity (K_d of nM level) with DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non integrin) receptor. DC-SIGN is a C-type lectin present on the surface of membranes of dendritic and monocyte/macrophage cells (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000; Geijtenbeek, Torensma et al. 2000).

Submucosal DC, which normally process and present antigens to immune cells, bind HIV-1 using C-type lectin essentially at the vaginal mucosa. However this interaction does not trigger the conformational changes necessary for the fusion of the virus and DC membranes. But virus bound on DC, or internalized by endocytosis, can migrate to regional lymph nodes where its target T-helper cells are found. Thus, dendritic cells expressing DC-SIGN appear to act as a "Trojan horse" facilitating the spread of the infection from mucosal surfaces to lymphatic organs (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000; Geijtenbeek, Torensma et al. 2000; Kwon, Gregorio et al. 2002).

After entry and uncoating, the viral genome is released into the cytoplasm. This step is concomitant with the start of reverse transcription. The resulted dsDNA migrates into the nucleus where it is integrated by the viral integrase into host genome. The integration site is preferentially located into active genes locus because HIV like many other viruses cannot replicate into quiescent/latent cells. This DNA is flanked by two repeated sequence named LTRs (Long Terminal Repeats). Following cell activation, the viral DNA is transcribed by cellular RNA polymerase II (RNA pol II). Viral transcription is initiated when cellular RNA pol II is recruited at the 5' end of LTR provirus. For efficient transcription elongation a 5' end TAR-hairpin structure named TAR (Tat associated region) element have to be present and bind HIV Tat protein. When Tat protein is absent, the initiation can begin but elongation is abrogated and/or inefficient. After translation, of viral protein and assembly in cholesterol rich lipid rafts, immature virions are released by budding from plasma membrane infected cells.

1.3 HIV-1 genome transactivation: an essential role of HIV-1 Tat protein

Once integrated, HIV genome behaves like the host genes and can be transcribed using the cellular RNA pol II and host cell machineries in addition to the viral Tat protein. The HIV LTR contains proximal core sequence and a distal promoter. The core element is composed by the initiator (Inr) and TATA box (TATA). The distal promoter carries enhancer sequences that contain two NF- κ B and three SP1 binding sites that position RNA pol II at the correct site for transcription initiation (Peterlin and Trono 2003; Peterlin and Price 2006). Downstream the core element, HIV LTR contains a short nascent stem bulged loop leader RNA named TAR (Transcription associated Region) (Berkhout, Silverman et al. 1989; Jeang, Xiao et al. 1999). HIV Tat protein is known to be the transcriptional activator that binds to this TAR RNA structure and HIV transcription mediated by Tat is illustrated in figure 4.



The first step of HIV transcription consists of the formation of the pre-initiation complex by RNA pol II recruitment to the promoter. The second step consists to clear the promoter by phosphorylation of the RNA pol II at serine position 5 of the CTD by cyclin dependent kinase : CDK7 of the TFIIH protein. This phosphorylation increases the binding and affinity of human enzyme capping (Brenchley, Price et al. 2006) that leads to the 5'end capping of nascent RNA transcripts. At this step a pausing of RNA pol II occurs by the recruitment of two negatives elongation factors named: DSIF (DRB sensitivity inducing factor) and NELF. Finally, productive elongation occurs by the recruitment of P-TEFb. P-TEFb activity is tightly regulated by its association with a complex composed by 7SK snRNA and heterodimer HEXIM1/2. Tat recruitment of P-TEFb leads to efficient elongation and the obtaining of totally RNA transcripts production.

Fig. 4. Transcription of the HIV genome and implication of its Tat protein.

For summary, after PIC formation and clearance of the promoter a pause of RNA pol II occurs. Without recruitment of P-TEFb (positive transcription elongation factor b), only short RNA transcripts are formed and subsequently aborted. In fact, in absence of Tat, transcription is initiated but elongation do not occurs and only short RNA abortive transcripts are produced (Peterlin and Price 2006). At a molecular level, P-TEFb can be recruited by several mechanisms (figure 4) and notably by HIV Tat protein. Indeed, transcription from the HIV-1 LTR is several hundred folds higher in presence of Tat than in its absence. So, the question that follows is how can HIV initiate the synthesis of the first viral proteins, including Tat protein, in the absence of the latter viral factor essential for an efficient elongation ? Or how the first Tat molecules are synthetized ?

Several studies have demonstrated that, in HIV, LTR transcription can be separated in two steps, the first is Tat independent whereas the second is Tat dependent. Recent studies from Greijtenbeek et al. and Gringhuis, van der Vlist et al. (Greijtenbeek et al. 2000; Gringhuis, Van der vlist et al. 2010) have shown that HIV can activate initiation and elongation by two separate mechanisms. The first, transcription initiation, is activated in endosomal structure following the HIV RNA-Toll Like Receptor 8 (TLR8) interaction. More precisely, HIV ssRNA-TLR8 interaction induces activation of NF- κ B p65 and RNA pol II phosphorylation at serine 5 residue leading to the recruitment of CDK7 to the transcription units. In parallel, they have also shown that elongation depends upon gp120-DC-SIGN interaction. This membrane interaction activates elongation by phosphorylation of serine 276 and serine 5 of NF- κ B p65 and RNA pol II respectively and their recruitments with CDK9 to the HIV LTR. This mechanism can explain how the HIV initiates the production of the first HIV-Tat protein. Then, Tat proteins take over and amplify viral transcription by its capacity to bind the 7SK small nuclear RNA (7SK nRNA) complex and recruits P-TEFb to the paused RNA pol II, by interacting cooperatively with TAR element. This interaction is mediated by Tat arginine rich motif. Once recruited to the transcription units, P-TEFb phosphorylates NELF (negative elongation factor) and the CTD of RNA pol II at serine 2 residue. Tat has also been reported to interact with many factor/co-factor implicated in transcription as: Sp1, TATA box binding protein, CDK2, CBP/p300, TFIIF and RNA pol II. Overall, Tat permits an efficient elongation and co-transcriptional processing by splicing and polyadenylation machineries. When levels of the regulatory Tat protein fall to below threshold levels, HIV becomes latent.

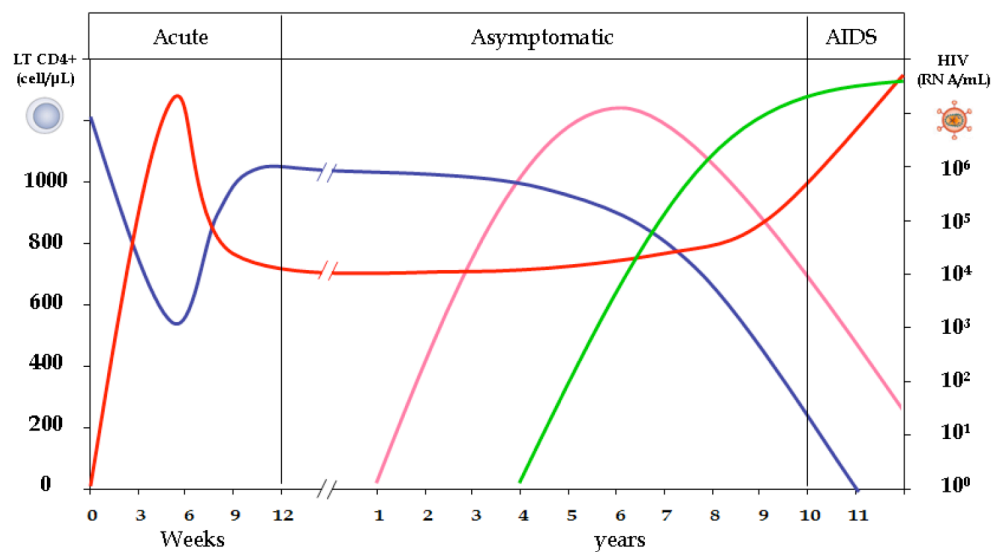
1.4 HIV-1 infection and its effects on immune and the central nervous system

1.4.1 Natural history of HIV-1 infection

The course of HIV infection could be divided into three distinct clinical phases: acute infection, asymptomatic stage or chronic infection and symptomatic stage characterized by AIDS development (Furrer, Opravil et al. 2001) (figure 5).

The first step called acute phase corresponds to the contamination, the primary viral replication and the beginning of immune sensitization. The most common routes of HIV infection are mediated by sexual transmission of the virus, transfusion by contaminated blood products, the use of unsafe needles by drug users, and perinatal transmission from infected mother to infant. This latter case of HIV transmission can occur either in utero or during breast-feeding (Coovadia, Rollins et al. 2007). Cases of contamination during delivery are also reported. Early after exposure, the virus reaches some strategic organs such as the secondary lymphoid organs (mucosa-associated lymphoid tissue and gut-associated lymphoid tissues), which content most of the cells targeted by HIV. At this stage,

the virus replicates actively during a period of 6 to 12 weeks called the acute phase. Viral load reaches several millions copies of viral RNA per millilitre (ml) of plasma. T cells are depleted in blood and the gastro-intestinal tract, but the pool of T cells present in the blood compartment was restored by the central lymphoid organs. In general this step remains asymptomatic, but some patients could develop signs of routine infection including, fever, lymphadenopathy and rash (Quinn 1997). These symptoms may last in general two to three weeks. At this stage of infection, the innate and adaptive immune systems react strongly to control HIV replication to lower the viral load to a set point often below 20000 RNA copies per ml of plasma (figure 5).



A generalized graph that represent the relationship between T cells number by blood microliter (blue line) and HIV viral RNA copies by blood ml (red line) over the time course of untreated HIV infection. Two major mechanisms involved in T cells dysfunction and progression toward AIDS are represented (arbitrary units) such as increase in pro-inflammatory factors $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 , $\text{IFN-}\alpha$ (pink line), and upregulation of immunosuppressive factors including IL-10 , PD-1 , PD-L1 and IDO (green line).

Fig. 5. Evolution of T cell count and viral load over the different stages of untreated HIV infection.

The second stage is an asymptomatic phase where the virus persists and the infection becomes chronic. During this period, that varies from 6 months to several decades depending on the patients, the virus replicates continuously mainly in the reservoir cell such as macrophages, the nervous system and regulatory T cells (Treg) (Tran, de Goer de Herve et al. 2008). During this phase, most of the patients maintain a normal CD4 T cell count with apparent normal health. The immune system is still continuously activated against viral replication but HIV will escape to this immune pressure by different mechanisms including the emergence of new variants. One of the most dramatic viral emergence is the appearance of X4 and dual tropic R5/X4 viruses, which replicate more rapidly, produces high amount of viruses progeny and are more cytopathic (Schuitemaker,

Koot et al. 1992; Connor, Sheridan et al. 1997; Singh and Collman 2000). In fact, a loss of CD4⁺ cells of about 30 to 60 cells per microlitre and per year was observed in HIV-1 infected patients (figure 5). This asymptomatic phase has duration of 6 to 10 years and may be greatly modulated by highly anti-retroviral therapy (HAART). However in less than 1% of HIV-1 infected patients this asymptomatic phase is highly reduced (1 to 2 years), and can last longer, more than 25 years, in patients under HAART (Markowitz, Mohri et al. 2005). In addition to the direct lyses of infected cells this phase is accompanied with several immune disorders leading to immune exhaustion.

One hallmark of this immune disorder is chronic immune activation characterized by increase production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6. TNF- α , thus, lead to the activation of HIV replication, loss of CD4 and CD8 through apoptosis (Said, Dupuy et al. 2010) and to neuronal disorders including HIV associated dementia (Nixon and Landay 2010). Increase of IL-6 production has been associated with immunological disorders including B cell lymphoma and hypergammaglobulinemie. It is interesting to note that Tat protein is able to induce TNF- α and IL-6. Production of these two cytokines has also been correlated with a systemic increase of bacterial products such as LPS. Indeed Brencley et al., (Brenchley, Price et al. 2006) have shown that chronic phase of HIV infection is characterized by an increase in circulating bacterial products related to the damage of the intestinal epithelium by the HIV-1 cytopathic effect. Released viral antigens and bacterial products contribute to the constant persistence of a chronic immune activation and T cells death. Other mechanism involved in immune activation is mediated by IFN- α produced by plasmacytoid DC (pDC), a particular DC population specialized in antiviral immunity. It was reported that HIV induce IFN- α production by pDC through the activation of TLR7 by viral ssRNA. This cytokine acts on CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes to induce an activated phenotype (CD69⁺, CD38⁺) and will in turn lead to T cell apoptosis (Martinson, Montoya et al. 2010). This great and continual immune activation fails, however, to contain HIV infection. This phenomenon could be explained by the upregulation of several immunosuppressive factors that impaired T cell responses. Among those, it has been reported an a) increase in the production of the immunosuppressive cytokine IL-10, principally by monocytes cells; b) increase expression of programmed death 1 (PD-1) on monocytes (Said, Dupuy et al. 2010), LT CD4⁺ and LT CD8⁺, and its ligand PD-L1 on monocytes, macrophages, mDC and pDC. Subsequently, PD-1/PD-L1 interaction stimulates IL-10 production, induces negative signals for TCR activation and leads to T cell death; c) enhancement in the activation of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in mDC and pDC which acts by depleting the essential amino acid tryptophan and inhibits T cell proliferation and d) increase in the generation and activation of T reg, a subset of T lymphocytes with immunosuppressive activity. All of these immunosuppressive factors will contribute to immune inactivation and have been associated with disease progression to AIDS. As the CD4⁺ cell count drops below 200 cells/mm³ the risk of developing opportunistic infections including *pneumocystis carini*, CMV, JC or malignancies increases Kaposi's sarcoma (Clifford and Demierre 2005; Bonnet, Balestre et al. 2006). Advanced HIV-disease is characterized by a strong T CD4 depletion to less than 50 cell/mm³, high viral load and multiple opportunistic infections and malignancies.

AIDS represents the final stage of HIV-1 infection and is characterized by a profound depletion of CD4 positive T cells. In fact, after several years of unresolved chronic infection,

the rate of CD4⁺ T cells drops dramatically in the blood to a critical rate of 200 T CD4 cells microliter. This phase is characterized by the occurrence of several rare opportunistic infections. The first opportunists that are taking advantage of immunocompromised patients are oral candidiasis, pneumococcal infections, mycobacterial infections and reactivation of herpes simplex and varicella virus. AIDS is also associated with tumor proliferations such as Kaposi's sarcoma, due to Human Herpes Virus 8 (HHV8), lymphoma associated with Epstein-Barr virus and cervical and anal carcinoma associated with human papilloma virus. In fact, this stage results in an extreme immunosuppression with diverse clinical features including opportunistic infections, malignancies and neurological disorders (So, Holtzman et al. 1988; Coopman, Johnson et al. 1993; Simpson and Tagliati 1994) and without treatment will irretrievably lead to death of the patient within a few months.

1.4.2 Neuropathogenesis of HIV-1 infection

In addition to its tropism for the cells of the immune system, HIV is also known for its neurotropism. The virus is early found in the CNS carried by infected cells essentially macrophages. The virus can be directly isolated and cultured from the cerebrospinal fluids (CSF) from HIV-1 infected patients. In the CNS the virus replicates strongly in macrophages and microglia and moderately in astrocytes. Although HIV-1 is qualified as a neurotropic virus, it does not infect neurons. Consequently to CNS infection, about 60% of HIV-1 infected patients showed HIV associated neurological, which includes dementia and neuropsychiatric and cognitive motor impairments (Ozdener 2005; Giunta, Obregon et al. 2006). Infiltration of the virus in the brain is concomitant with the development of astrocytosis and microgliosis. While HIV-1 productively replicates in macrophages and microglia, infection of astrocytes allow only, the expression of early proteins Rev, Tat and Nef (Tornatore, Nath et al. 1991; Lipton and Gendelman 1995; Kutsch, Oh et al. 2000). It is interesting to note that astrocytes function also as an reservoir for HIV-1. Neuronal injury observed in the CNS of HIV-1 infected patients results from the activation direct by the virus or indirectly by inflammatory neurotoxins. For example it has been shown that the infection of astrocytes allowed to the impairment of the uptake and secretion of glutamate and to the modulation of glutamate receptor expression (Bezzi, Carmignoto et al. 1998). It was also demonstrated that, by its Tat protein, HIV stimulates the production of various chemokines including MCP-1, IL-8 and IP-10 which participate in the recruitment of macrophages and various type of leukocytes (Conant, Garzino-Demo et al. 1998; Kutsch, Oh et al. 2000). Production by HIV-1 infected macrophages of neurotoxins including quinolate, glutamate and L-cysteine, and inflammatory mediators including, IFN- α , IFN- β , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , and TNF- β play an essential role in HAND. The loss of neurons in HAND by apoptosis and other mechanisms is directly related to these release of toxic mediators by activated and infected cells (Zink, Zheng et al. 1999). Tat, Nef, Vpr, gp120 and gp41 have been described as directly implicated as neuropathogenic factors. By acting with CXCR4, gp120 induces apoptosis of neurons. Also by acting on voltage gated calcium channels and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) gp120 induces calcium mobilization which mediates the production of reactive oxygen species (ROS), apoptosis and various neurotoxin mediators (Medina, Ghose et al. 1999). As gp120, HIV-1 Tat protein has been reported to be implicated in neuron injury directly via apoptosis (Sabatier, Clerget-Raslain et al. 1989; Shi, Raina et al. 1998; Nath, Haughey et al. 2000) and indirectly via the induction of inflammatory cytokines including TNF- α and IL-1 β .

1.4.3 HIV and Kaposi's sarcoma: Effect of Tat protein

The high incidence of Kaposi's sarcoma (KS) in patients with HIV-1 infection has been related to the co-infection with HHV-8 also named KSHV (Kaposi sarcoma-associated herpes virus) (Schulz, Arbusow et al. 1998; Sirianni, Vincenzi et al. 1998; Aoki and Tosato 2004). It was shown that the presence of KSHV alone is not sufficient for KS development. The presence of HIV-1 seems to be essential for the development of KS lesions. This observation is in agreement with the drastic decrease of KS in patients under HAART. The analysis of the HIV-1 viral factor implicated underlined the essential role of Tat protein which acts as a transactivator factor for KSHV lytic cycle and activates proliferation, MAP-kinase activation, angiogenesis and tumorigenesis. It was shown that Tat promotes the tumorigenesis of endothelial cells both by acting at different ways by: stimulating the production of β -FGF, recruiting VEGF-2 receptor, both on KS and on endothelial cells, whose stimulation is essential for VEGF angiogenic effects (Albini, Benelli et al. 1996; Albini, Soldi et al. 1996; Ganju, Munshi et al. 1998), blocking apoptosis, and stimulating KSHV replication (Pyakurel, Pak et al. 2007). In addition Tat is able to stimulate the production of inflammatory cytokines following its interaction with chemokine receptors.

1.4.4 HIV and immunological disorders

From the asymptomatic stage and before T CD4 lymphocyte depletion, a generalized immune depression is observed in HIV-1 infected patients including disorders of both in the specific/acquired and innate immunities. This immunodepression in HIV-1 infected patients is associated with a profound alteration of the cytokine production (McMichael, Borrow et al. 2010; Clerici and Shearer 1993; Fauci 1996). These alterations have effects on target cells and influence also the virus replication. Increased production of pro-inflammatory cytokines stimulates HIV-1 replication *via* the activation of NF- κ B pathway. In fact the LTR promoter of HIV-1 contains NF- κ B binding sites. HIV-1 infection is associated, since the asymptomatic stage with a chronic immune activation and dysfunctional cytokine production. The acute host response to primary HIV-1 infection is characterized by Th0 cytokine profile, including the pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- α/β and IFN- γ as well as the anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10 and IL-13 (Harrich, Garcia et al. 1989; Hatada, Saito et al. 1999). At later stages of infection with disease progression, the pattern of cytokine production shifts toward a strongly based Th2 response mediated by IL-4, IL-6 and IL-10 (Rinaldo, Armstrong et al. 1990; Graziosi, Gantt et al. 1996; Takizawa, Ohashi et al. 1996). This profile was revealed inefficient to eradicate the virus. The mechanism of HIV induced cytokine production has been largely studied. There are many HIV-1 proteins that are capable of inducing the production of several cytokines. These proteins include HIV-1 glycoprotein gp120 that induce the secretion of many pro-inflammatory cytokines including IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , and IFN- γ (Francis and Meltzer 1993; Ameglio, Capobianchi et al. 1994; Ankel, Capobianchi et al. 1994; Capobianchi, Barresi et al. 1997). Interestingly, gp120 is also able to induce the secretion of IL-4 and IL-13 in basophils and IL-10 in mononuclear cells. Nef protein is able to induce the production of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-15, TNF- α and IFN- γ in various human leukocyte populations (Schols and De Clercq 1996; Patella, Florio et al. 2000). There is also evidence that Vpr induces the expression of IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and IFN- γ in a variety of cell types (Brigino, Haraguchi et al. 1997).

Another HIV-1 protein, Tat, is known to stimulate the production of many cytokines and chemokines including IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and MCP-1 (Clerici and Shearer 1993; Moore, O'Garra et al. 1993; Badou, Bennasser et al. 2000; Nath, Haughey et al. 2000;

Bennasser, Badou et al. 2002; Bennasser and Bahraoui 2002; Contreras, Bennasser et al. 2005). Our laboratory has shown that HIV-1 Tat protein induces the production of IL-10, a highly immunosuppressive cytokine by human peripheral blood monocytes. Since IL-10 levels have been shown to progressively increase as the disease progresses toward AIDS, one can hypothesize that this event can play a crucial role in the immune deregulation observed during HIV-1 infection. In line with this hypothesis, Shearer's group in a study including more than 1000 patients identified four patient classes depending on the capacity of their CD4 T lymphocytes to respond to different stimuli (mitogen, alloantigen, influenza virus, and HIV antigens). The progressive loss of the response of the immune system to these stimuli was found to be associated with a course leading to AIDS. Considerable production of IL-10 by peripheral blood mononuclear cells was observed in these patients and paralleled the alteration in CD4 T cell proliferative function. In addition, the immunosuppressive effect of IL-10 also correlated with the restoration of the capacity of isolated mononuclear cells of patients infected by HIV and immunodepressed to proliferate *in vitro* after stimulation by peptide antigens of HIV-1 envelope glycoprotein in the presence of a neutralizing anti-IL-10 antibody (Clerici, Wynn et al. 1994). In another study, Stylianou et al. evaluated the level of IL-10 in the sera of HIV-1 infected patients at different stages of infection. In agreement with Shearer's conclusion, they showed an increase in IL-10 level with disease progression. They also showed a decrease in IL-10 level in patients under highly active retroviral therapy (HAART). Inversely, it was reported an increase of IL-10 levels in patients with failure in tri-therapy treatment. Similarly low level of IL-10 was observed in HIV-1 long term non progressors or elite controllers (Clerici, Wynn et al. 1994). Inversely, it was showed that the persistence of a great level of IL-10 in the sera correlates with the failure in HAART (Stylianou, Aukrust et al. 1999).

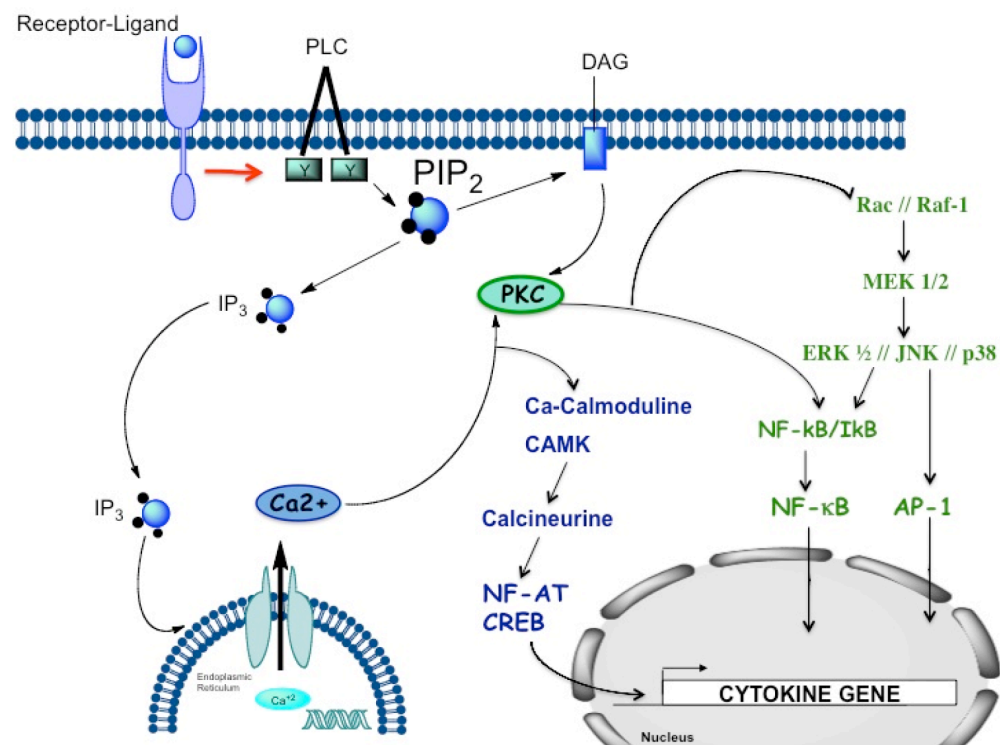
HIV-1 infection affects cellular signaling. The two most important signaling pathways involved in cytokine production include the PKC and calcium pathway (figure 6). These pathways are activated after ligand-receptor interaction. Subsequently, this interaction activates phospholipase C which then cleaves its substrate PIP2 (phosphoinositol biphosphate) in IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate), responsible of the mobilization of intracellular calcium and to DAG (diacylglycerol), which initiates PKC activation. These two pathways lead to the phosphorylation and activation of cellular proteins mitogen-activated protein (MAP) kinase and of transcriptional factors including NF-AT, NF- κ B, CREB and AP-1 responsible for the induction of cytokine genes (Spitaler et Cantrell 2004). In our laboratory we have accumulated several data showing the mechanism recruited by Tat protein to stimulate the production of the highly immunosuppressive cytokine IL-10. In the following part we will describe the role of Tat protein at different levels including its structure, secretion and uptake, mode of action for the transactivation of HIV-1 transcription, activation of signaling pathways and in the conclusion we will discuss Tat as potential target for drug or vaccine development.

2. HIV Tat protein

2.1 Background

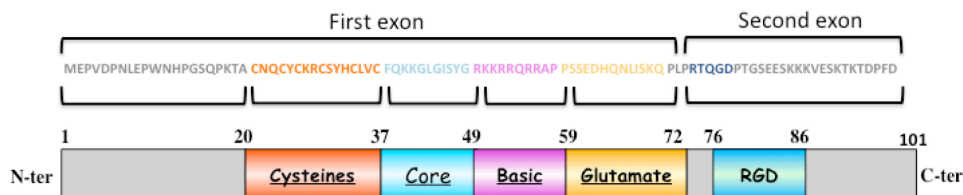
HIV Tat protein is one of HIV conserved protein. It is early produced after HIV infection. Tat is a 9-14 kDa protein encoded by two exons separated by a non coding region. The first exon encodes the 72 first amino acids (figure 7). The length of HIV-1 Tat protein ranges from 86 to 101 amino acids and consists of 130 amino acids for HIV-2 (Johri, Mishra et al. 2011).

The 101 amino acids form of Tat is predominant in clinical isolates. Another form that comprises 86 amino acids is also found in some subtype B isolates and in the laboratory strain HXB2. The Tat sequence can be subdivided into six functional domains including N-terminal a proline and cysteine rich region, an hydrophobic core, a basic region followed by a glutamine rich region and a C terminal domain that contain a tripeptide RGD (Arginine, glycine, aspartatic acid) (figure 7). In addition, a domain containing the basic region is also called protein transduction domain (PTD), which renders Tat to have the ability to cross cell membranes and to be used as vector for gene transfer. Thus, viral Tat protein can be either intracellular or extracellular. The main function of HIV Tat protein is to transactivate the HIV long term repeat for retroviral transcription.



External stimulus activates a G protein coupled receptor, which activates a stimulating G protein. This G protein activates phospholipase C (PLC), which cleaves phosphoinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) into 1,2 diacylglycerol (DAG) and inositol-1, 4, 5-trisphosphate (IP₃). The IP₃ interacts with calcium channel in the endoplasmic reticulum (ER), releasing calcium (Ca²⁺) into the cytoplasm. Intracytosolic calcium can interact with calmoduline proteins. This, leads to the activation of CAM kinases and calcineurine. Activation of CAMK and calcineurine induce activation and nuclear translocation of CREB and NF-AT respectively. In other hand, the increase in calcium levels activates PKC, which translocates to the membrane, anchoring to DAG and phosphatidylserine. Active catalytic PKC then, phosphorylate targets such as Rac, Raf that lead to downstream activation of MAP kinases and NF-κB and AP-1 transcription factor.

Fig. 6. The Protein Kinase C and calcium pathways.



Tat is encoded by 2 exons in the HIV genome and it is composed by several regions. N-ter region 1-21 is a rich proline region. A region implicated in HIV transactivation is the 21-37 amino acids cysteine rich region and the core region 38-48 implicated in the Tat binding of HIV RNA. The basic rich region 49-59 is involved in Tat internalization whereas the glutamine rich region 60-72 in HIV replication. Finally the last region with the RGD sequence is encoded by the second exon.

Fig. 7. Organization of HIV-1 Tat protein: primary amino acids sequence and different domain of Tat.

2.1.1 HIV-1 Tat structure

Few studies have been devoted to studying secondary and tertiary structure of Tat protein. It seems clear that Tat belongs to the family of intrinsically unstructured proteins (Foucault, Mayol et al. 2010; Bayer, Kraft et al. 1995). Circular dichroism studies of Tat (analyze of secondary structure) showed a majority of β -turns structure and the absence of α -helical and β -sheets structures when the spectra were performed in aqueous solutions. However about 20 to 50% of alpha helical structures were detected when the protein was analyzed in organic solvent. Tertiary studies with using NMR confirmed that HIV Tat was generally an unfolded protein (Bayer, Kraft et al. 1995; Shojania and O'Neil 2006). They also demonstrated that the cysteine and basic regions are highly flexible and the N-terminal region is localized between the hydrophobic core and the glutamic rich domains (Watkins, Campbell et al. 2008). The X-ray crystallographic determination of Tat structure is not available. In summary all the available data indicated that Tat contains no ordered α -helical or β -sheet structures. Thus the biological active Tat protein seems to be conformation independent and perhaps only a limited gain of structure is necessary for its function. All these studies suggest that Tat protein does not have a defined secondary or tertiary structures and that biological active Tat protein is natively unfolded and only a limited gain of structure is necessary for its function.

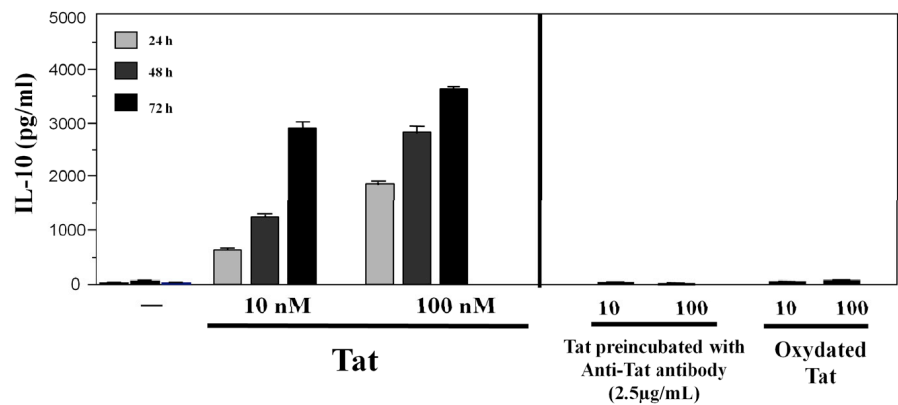
2.1.2 HIV-1 Tat secretion and internalization

Despite the importance of extracellular Tat, few studies have focused on its mechanism of secretion from infected cells and its entry into uninfected cells (Rayne and Debaisieux et al. 2010; Vendeville and Rayne et al. 2004) (Westendorp, Frank et al. 1995). In fact, HIV Tat protein does not have a signal sequence and seems to be secreted by infected cells by a non conventional pathway. It is found present in the sera of HIV-1 infected patients at the nanomolar level (Ensoli, Buonaguro et al. 1993; Xiao, Neuveut et al. 2000) a value which may be underestimated since Tat may be trapped by its potential receptors, and particularly the heparan sulfates which are largely expressed on cell surfaces. Thus, the concentration of Tat, *in vivo*, is probably higher in the vicinity of the active HIV replication sites. After its secretion, Tat protein is taken up by neighboring cells infected or not. Despite the previous data reporting a particular mechanism for Tat uptake, it is clear now, that Tat protein enter

viable cells essentially by endocytosis. This entry is mediated by the basic domain of Tat, also named PTD (protein transduction domain) and used for the development of peptidic vectors (Futaki and Suzuki 2001).

2.2 Tat activates the production of IL-10 in human monocytes

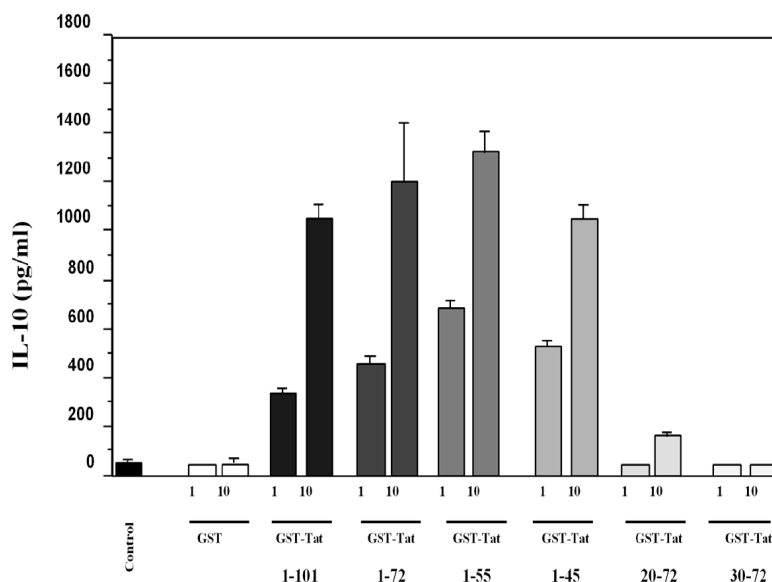
Our group has shown that HIV-1 Tat protein, by acting at cell membrane level, induces the production of IL-10, by non infected human monocytes (Badou and Bennasser 2000; Bennasser and Bahraoui 2002). To this end monocytes from healthy donors were purified and stimulated during 24 hours with increasing concentrations of recombinant Tat protein. Results showed that Tat protein induced strong and dose dependent IL-10 production. In contrast in the absence of Tat no IL-10 production was observed. This Tat induced IL-10 production persists after 48 and 72 hours of Tat stimulation. The amount of IL-10 produced by monocytes in response to Tat is dose and stimulation time dependent. Specificity of Tat effect was demonstrated by showing that chemically modified Tat, after H₂O₂ oxidation, becomes unable to stimulate IL-10 production. The specificity of Tat effect was further demonstrated by showing that when the stimulation of monocytes was performed in the presence of anti-Tat antibodies, IL-10 production by monocyte was totally inhibited (figure 8).



Tat 1-86 at 10 and 100 nM were incubated with or without anti-Tat antibody 2.5 µg/mL or were oxidated by H₂O₂ treatment. After 1 hour treatment, Tat treated or not, was incubated with human primary monocytes for 24h. IL-10 production was measured by ELISA.

Fig. 8. HIV-1 Tat induces specifically IL-10 production by human monocytes.

To determine the active domain of Tat that is responsible for the activity of Tat, monocytes were stimulated with GST-Tat deleted mutants including GST-Tat 1-72 (deleted from RGD domain), GST-Tat 1-55 (deleted from RGD and glutamate domains), GST-Tat 1-54 (deleted from RGD and basic domains), GST-Tat 20-72 (deleted from the N-Terminal domain), and GST-Tat 30-72 (deleted from de N-Terminal domain). Only GST-Tat deleted mutants but containing the N-terminal domain continues to stimulate IL-10 production. While the deleted mutants GST-Tat 20-72 and GST-Tat 30-72 as GST alone were unable to stimulate IL-10 production (figure 9). These data underlined the importance of the N-Terminal domain in IL-10 Tat induced activity.



Monocytes were treated with 1 and 10 nM of wild type GST-Tat 1-101 or deleted mutant of Tat or GST alone as negative control. After 24 h of stimulation IL-10 production was measured by ELISA.

Fig. 9. The N-terminal domain of Tat : 1-45 is sufficient to induce IL-10 production by human monocytes.

As previously demonstrated in different report Tat protein is able to enter cells and to localize in the nucleus. So Tat protein is able to activate IL-10 production by acting at the cell membrane level or inside the cell. To understand its mechanism of action during the first steps of the activation, Tat protein was immobilized by coating in wells before adding purified human monocytes. In this condition, immobilized Tat leads to a dose dependent production of IL-10 indicating that Tat mediates its action by acting at the cell membrane. These results are in line with the capacity of the Tat deleted mutant, GST-Tat 1-45, to stimulate IL-10 production. In contrast to native Tat protein, the deleted mutant GST-Tat 1-45 is unable to penetrate into cells because it lacks the basic domain, responsible for penetration and nuclear localization of Tat.

The specific receptor implicated in this interaction remains to be characterized, despite the fact that different regions of Tat have been implicated in interaction with various receptors: the N-terminal region with CD26 receptor (Gutheil, Subramanyam et al. 1994), the tripeptide RGD with integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ of DC, and the basic region with membrane lipids and the VEGFR of endothelial cells (Rubartelli, Poggi et al. 1998). Other reports, demonstrated the interaction of the cysteine rich region of Tat 24-51 with CCR2, CCR3 and CCR5 chemokine receptors and the heparan sulfate proteoglycans (Johri, Mishra et al. 2010; Ensoli, Buonaguro et al. 1993). It has been proposed that Tat could interact with the coreceptor CXCR4 and thus competitively inhibit infection by X4-tropic HIV-1 strains (Xiao, Neuveut et al. 2000). In this way, Tat contributes to immune system disorders as it induces apoptosis of T-lymphocytes, inhibits MHC class I expression, alters cell activity by blocking L-type channels (Li, Li et al. 2009).

Using chemical inhibitors and molecular analysis, we showed that Tat-cell interaction lead

induction. Downstream PKC, activation of MAP kinases and NF- κ B pathways by Tat is crucial for Tat induced IL-10 (Bennasser and Bahraoui 2002; Leghmari and Bennasser 2008; Leghmari and Bennasser 2008; Contreras 2008).

2.3 Analysis of the activated signaling pathways

Calcium and PKC pathways are activated following the action of the phospholipase C (PLC). Implication of PLC signaling in the production of IL-10 following Tat activation was evaluated by using U73122, an inhibitor of PLC. In the presence of this inhibitor a strong inhibition, more than 50% of the production of IL-10 by Tat was observed. Thus, the activation of PKC signaling pathways known to induce the expression of cytokine genes was further investigated.

2.3.1 Tat activates PKC pathway

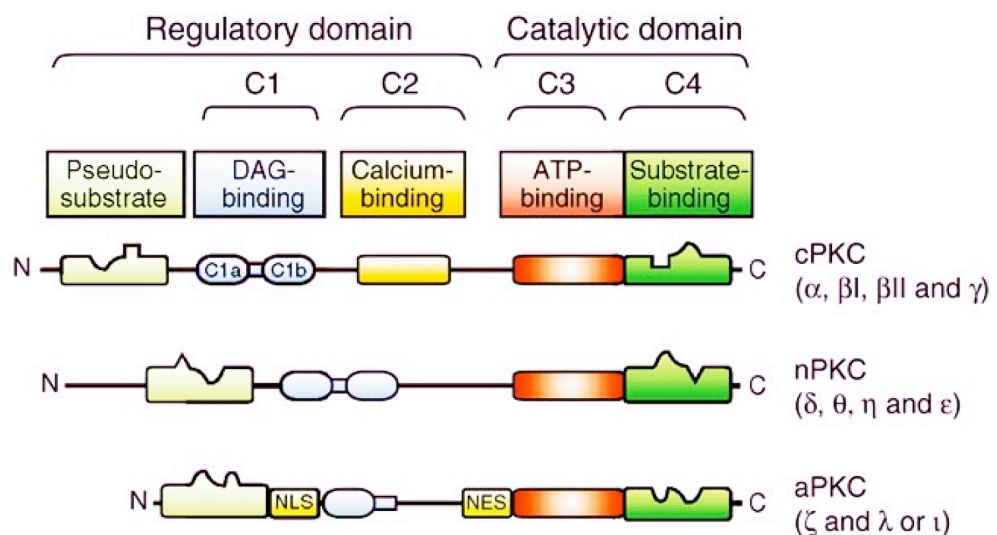
2.3.1.1 The PKC pathway

The PKC belongs to the serine/threonine kinase family. It represents a key element recruited to regulate cell responses to external stimuli. Eleven PKC isoforms have been identified and classified into three groups based on their ability to be activated by Ca^{2+} and DAG (Spitaler and Cantrell 2004). The classical PKC- α , - β I, - β II and - γ , isoforms are activated by Ca^{2+} and DAG, the novel PKC- θ , - η , - δ and - ϵ , are Ca^{2+} independent but DAG dependent, finally the atypical PKC- ζ , - μ and - λ (also named - α in murine cells) are Ca^{2+} and DAG independent (Lee, Duan et al. 2008) (figure 10). PKC are single polypeptide chains of heterogeneous size, ranging from 67.2 kDa for PKC- τ to 83.5 kDa for, PKC- ϵ . Each PKC isoform is the product of a separate gene, except for PKC- β I and PKC- β II which are alternative spliced variants of the same gene. At the structural level, PKC contained four conserved domains (C1 to C4) (figure 10) and five variable regions (V1 to V5) that encode isoform-specific properties. The conserved region mediates binding to the activating cofactors: C1 for DAG or to PMA when used as pharmacological tool, and C2 for Ca^{2+} .

2.3.1.2 Effects of HIV-1 Tat on PKC pathway

The implication of PKC pathway in the control of IL-10 production mediated by Tat was analyzed by complementary approaches. Pre-treatment of cells with Ro31-8220, an inhibitor of all PKC isozymes inhibits totally Tat induced IL-10, thus demonstrating the crucial role of PKC pathway. In agreement with the essential role of PKC pathway, Tat becomes unable to stimulate IL-10 production in monocyte previously treated during 48h with PMA. In order to understand the nature of PKC isoforms activated by Tat and essential for IL-10 production, monocytes isolated from healthy donors were cultured in the presence of Tat at 10 or 100nM and cytoplasmic and membrane proteins were isolated after 30 min or after 1 or 2 hours. Whereas PKC is localized in the cytoplasm in unstimulated human monocytes, Tat stimulation induces in a dose dependent manner, PKC translocation to the membrane indicating PKC activation. This activation observed after 30min of Tat stimulation reaches a peak in 1h and decreases after 2 hours of stimulation. Thus HIV-1 Tat induces PKC activation in a dose and time dependent manner in human monocytes. To investigate the involvement of PKC activation in Tat-induced IL-10 production, monocytes were incubated with different PKC inhibitors. Ro318220 as well as Gö6983 which inhibits several PKC isoforms including PKC- α , - β (IC₅₀= 7 nM), PKC- γ (IC₅₀ = 6 nM), PKC- δ (IC₅₀ = 10 nM), PKC- ζ (IC₅₀= 60 nM) and PKC- μ (IC₅₀ = 20 μ M) totally inhibit IL-10 production (Bennasser

and Bahraoui 2002; Leghmari and Bennasser 2008; Contreras 2008). Gö6976 which inhibits classical PKC isoforms α and β I has no effect on the capacity of Tat to induce IL-10 production by monocytes. Altogether, these results suggest that PKC isoforms α , β I and μ are not primarily involved in the signaling pathways implicated in IL-10 production. To evaluate the implication of PKC- β II and δ two other inhibitors were used. Hispidin, PKC- β I and β II inhibitor ($IC_{50} = 20 \mu M$), and rottlerin, an inhibitor of PKC- δ ($IC_{50} = 3-6 \mu M$). Hispidin used at $2-20 \mu M$ inhibits IL-10 production by Tat in a dose dependent manner, an inhibition of 60% is reached in the presence of $20 \mu M$ of Hispidin. The implication of PKC- δ in IL-10 production was further evaluated by using rottlerin $5-30 \mu M$. In these conditions an inhibition reaching 90% was observed. Interestingly, PKC- β II and PKC- δ inhibitors used separately at 2 and $5 \mu M$ inhibited IL-10 production induced by Tat by 15 and 45% respectively, but when used in combination, they inhibited IL-10 production by 85% thus suggesting a possible synergistic effect between these two PKC isoforms (Bennasser and Bahraoui 2002).

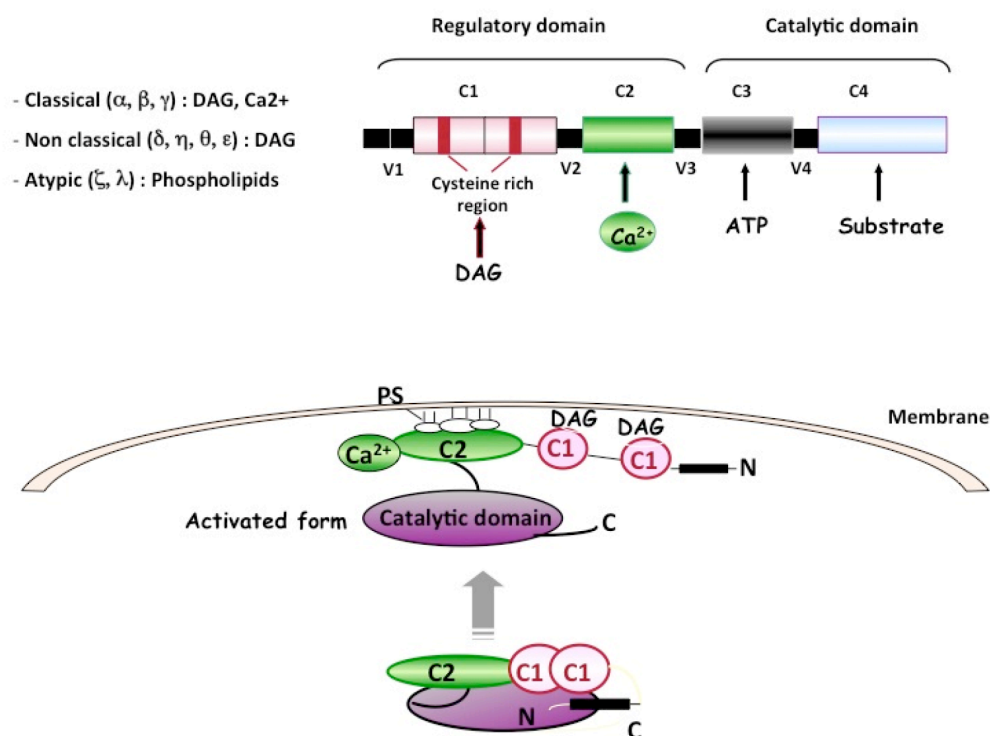


The three subgroups of PKC have been identified and their regulatory domains identified. The classical PKC isoforms (cPKC) share all typical regulatory features: the autoinhibitory pseudosubstrate motif, two DAG-binding C1 domains (C1a and C1b) and the calcium-binding C2 domain. Novel PKC isoforms (nPKC) lack a calcium-binding motif but contain an extended N-ter domain that can receive regulatory signals. They are regulated by DAG. The catalytic activity of atypical PKC isoforms (aPKC) is independent of DAG and calcium, and they seem to be regulated by regulatory proteins in association with the nuclear localization signal (NLS) and nuclear export signal (NES) in their regulatory domain.

Fig. 10. Primary structure and identification of the different PKC family and their functional domains adapted from Spitaler et Cantrell 2004.

After ligand-receptor interaction on the cell surface, phospholipids are hydrolyzed by PLC, producing DAG and IP₃ both acting as second messengers. Subsequently, DAG activates PKC, which in turn phosphorylates a range of cellular proteins. More precisely activation of PKC is mediated by phosphatidylserine (PS) binding domain that includes C2, the basic

pseudosubstrate peptide, and the cysteine rich region that contributes to the increased affinity of PKC to PS by interacting with DAG. These PS binding domains have also been reported to be involved in affinity, PKC localization, membrane translocation and binding to potential receptors. In resting cells, PKC is localized in the cytoplasm in an inactive form where the pseudosubstrate sequence upstream from C1 binds to the catalytic domain, but cannot be phosphorylated since it lacks a phospho-receptor amino acid. Upon activation, Ca^{2+} and or phosphoinositides induce a conformational change leading to the release of the pseudosubstrate. Thus the catalytic site becomes accessible to anchoring proteins called RACK (receptor for activated kinase) or substrates STICK (substrate that interacts with C-kinase). This PKC activation is accompanied by a translocation from the cytoplasm to the membrane. Subsequent to membrane translocation and PKC activation, a second messenger seems to be stimulated and leads to the phosphorylation of PKC binding proteins thus, reducing their affinity for PKC and PS.

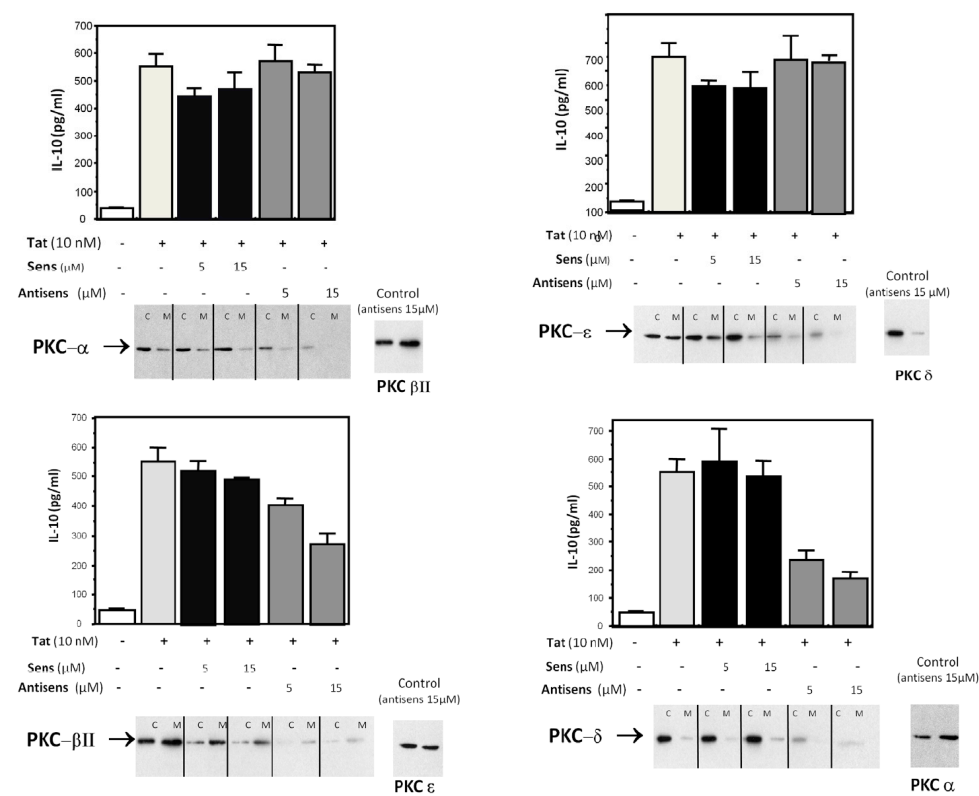


In the cytoplasm, PKC is present as an inactive form. After its activation by phosphorylation, it undergoes conformational modifications leading to its translocation from the cytoplasmic to the membrane compartment. In membrane compartment, PKC associates with a second messenger DAG (and in the case of classical PKC isoforms, calcium) produced after receptor stimulation. Binding to the second messengers is also required for the release of the pseudosubstrate motif from the active site to give an active enzyme.

Fig. 11. Activation of PKC pathway

We next investigated which isoforms of PKC are activated by Tat protein. Monocytes were incubated with Tat at 10 nM for 15, 30 min or 1 hour and PKC localization was analyzed by

western blot using specific antibodies. Results showed that as soon as 15 min Tat induces translocation to the membrane of four PKC isoforms: PKC- α , PKC- β II, PKC- δ , and PKC- ϵ . To further analyze the implicated PKC isoforms in Tat induced IL-10 production, these PKC isoforms activated by Tat were targeted with isoform specific antisense oligonucleotides. Monocytes were pre-incubated during 24 hours with PKC- α , PKC- β II, PKC- δ , and PKC- ϵ or with the corresponding sense sequences as negative controls. After 24h monocytes were stimulated during 1h by Tat at 10 nM and then the level of each isoform in the cytoplasmic and membrane compartments were determined by western blot (Bennasser and Bahraoui 2002). Treatment with 5 μ M of PKC- α antisense oligonucleotide down regulates PKC- α expression and the use of 15 μ M oligonucleotide totally inhibits PKC- α expression. The use of antisense PKC- α inhibits specifically PKC- α , since PKC- β II is still detected in the same monocytes and is activated by Tat at 10 nM (figure 12). The same specificity of inhibition



Monocytes were treated with sense or antisense oligonucleotides (5, 15 μ M) specific for PKC- α , PKC- β II, PKC- δ , PKC- ϵ . After washing, cells were stimulated with HIV-1 Tat protein at 10 nM for 1 hour. Isoform specific PKC inhibition was assessed by western blot (bottom). IL-10 production was measured by ELISA 24h later (Sirianni, Vincenzi et al. 1998). In each case, specific inhibition of each isoform was verified by visualizing in the same cell extracts another PKC isoform activation by Tat.

Fig. 12. Effects of isoform specific PKC inhibition with antisense oligonucleotides on Tat induced IL-10 production.

was observed with the other isoforms: PKC- β II, δ , and ϵ antisense oligonucleotides caused a specific down regulation in the level of their corresponding isoforms (figure 12). In agreement with the data obtained with chemical inhibitors, an inhibition of Tat induced IL-10 was observed in the presence of antisense oligonucleotides directed against PKC- β II and δ . In contrast no significant inhibition was observed with antisense oligonucleotides directed against PKC- α and ϵ (figure 12) (Bennasser and Bahraoui 2002).

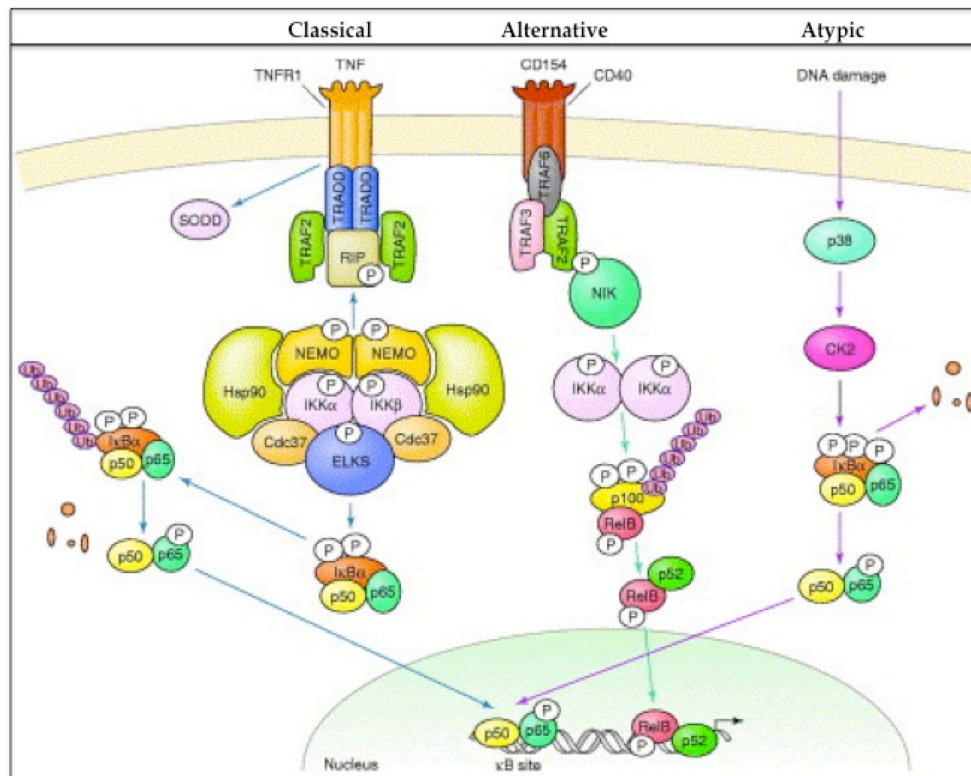
Overall, it was shown that HIV-1 Tat, activates four PKC isoforms in human monocytes: PKC- α , PKC- β II, PKC- δ , and PKC- ϵ . These data introduce a way to explore the role of PKC in signaling pathways in Tat activated monocytes and on search for the partners of PKC- β II and δ involved in the production of IL-10, an immunosuppressive cytokine that participates in the deregulation of the immune system as early as the asymptomatic stage of HIV-1 infection.

Monocytes were treated with sense or antisense oligonucleotides (5, 15 μ M) specific for PKC- α , PKC- β II, PKC- δ , PKC- ϵ . After washing, cells were stimulated with HIV-1 Tat protein at 10 nM for 1 hour. Isoform specific PKC inhibition was assessed by western blot (bottom). IL-10 production was measured by ELISA 24h later (Sirianni, Vincenzi et al. 1998). In each case, specific inhibition of each isoform was verified by visualizing in the same cell extracts another PKC isoform activation by Tat.

2.3.2 Tat activate NF- κ B pathway

In this part, we will describe the NF- κ B signaling pathways implicated in the IL-10 production induced by Tat protein in the human monocytes, and the mechanism of NF- κ B regulation exploited by this viral protein.

NF- κ B is a major transcriptional regulator for the expression of cytokines that are involved in the control of the immune and inflammatory response (Baeuerle and Baltimore 1996; Baldwin 1996). NF- κ B is a dimeric transcription factor that consists of REL family members, including RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 and p52 (Li and Verma 2002). p50 and p52 are derived from the larger precursors p105 and p100, respectively, through proteolytic processing by the proteasome. All NF- κ B proteins contain a highly conserved REL-homology domain (RHD) that is responsible for DNA binding, dimerization, nuclear translocation and interaction with the inhibitory proteins I κ B within the cytoplasm. The I κ B proteins, bind to NF- κ B and block its nuclear import and, thereby, its transcriptional activity. The p105 and p100 precursors also contain the I κ B-like repeats that must be degraded to generate the mature p50 and p52 subunits, respectively. In contrast to the other NF- κ B family members, p50 lacks a transactivation domain and therefore, usually forms heterodimers with p65 to bind to NF- κ B sites in the nucleus. Homodimers p50:p50 can also be formed but they act as a suppressor of inflammatory cytokine gene expression (Ghosh, May et al. 1998). Three distinct NF- κ B activating pathways have emerged (Viatour, Merville et al. 2005) (figure 13). Most of our knowledge concerns the "canonical" pathway, which mostly targets ubiquitous heterodimers p65:p50 and p50:c-Rel. The critical event in initiating this pathway is activation of an I κ B-phosphorylating protein kinase, IKK β /IKK2, which occurs within the "IKK signalosome", in association with a structurally homologous kinase, IKK α /IKK1, and an adaptor protein, IKK γ /NEMO (Yamaoka, Courtois et al. 1998). IKK β -mediated phosphorylation of I κ B α and leads to its proteasomal degradation and, hence, activation of its associated NF- κ B dimers that translocate in the nucleus. This pathway is normally triggered in response to microbial and viral infections or exposure to pro-inflammatory



The classical, alternative and atypical NF-κB-activating pathways as illustrated by the TNF-α-mediated, CD40-mediated and DNA-damage-mediated NF-κB activation pathways, respectively. In the classical NF-κB-activating pathway, upon binding of TNF-α to TNFR1, SODD is released from the receptor and triggers the sequential recruitment of the adaptors TRADD, RIP and TRAF2 to the membrane. Then, TRAF2 mediates the recruitment of the IKK complex composed of IKKα, IKKβ and NEMO. Hsp90 and Cdc37 are also part of the IKK complex and are required for IKK activation. Activation of the IKK complex leads to the phosphorylation of IκBα at specific residues, ubiquitination and its degradation via the proteasome pathway. Then, the heterodimer p50-p65 is released and migrates to the nucleus where it binds to specific κB sites and activates a variety of NF-κB target genes. The alternative pathway is triggered by binding of the CD40 ligand to its receptor, leading to recruitment of TRAF proteins and the sequential activation of NIK and IKKα, which induces the processing of the inhibitory protein p100. p100 proteolysis releases p52 which forms heterodimers with RelB. This pathway is NEMO-independent and relies on IKKα homodimers. The atypical pathway, which is triggered by DNA damage relies on sequential p38 and CK2 activations, and involves phosphorylation and degradation of subsequent IκBα via an IKK-independent pathway. Abbreviations: CK2, casein kinase 2; ELKS, Glu-Leu-Lys-Ser; Hsp90, heat shock protein 90; IκB, inhibitor of NF-κB; IKK, IκB kinase; NEMO, NF-κB essential modulator; NF-κB, nuclear factor-κB; NIK, NF-κB-inducing kinase; RIP, receptor-interacting protein; RSK1, ribosomal S6 kinase 1; SODD, silencer of death domains; TNF-α, tumour necrosis factor α; TNFR1, TNF receptor 1; TRADD, TNF-receptor-associated death domain protein; TRAF, TNF-receptor-associated factor; Ub, ubiquitin.

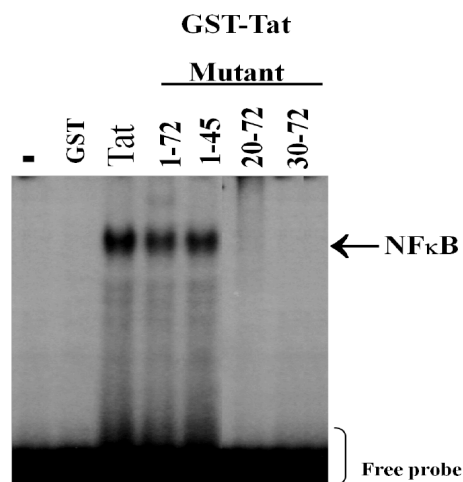
Fig. 13. Three pathways of NF-κB modified by Viatour & al. 2005.

cytokines such as tumour necrosis factor $\text{TNF-}\alpha$. By contrast, the “alternative” pathway, occurs independently of $\text{IKK}\beta$ or NEMO, but is dependent on NF- κB -inducing kinase and $\text{IKK}\alpha$. Activation of this pathway leads to a limited proteasomal processing of the NF- κB precursor protein, allowing the resulting p52 fragment to translocate to the nucleus in association with some NF- κB proteins (mainly RelB) (Xiao, Harhaj et al. 2001). This pathway is triggered by cytokines such as lymphotoxin B (Dejardin, Droin et al. 2002), or CD40 ligand (Coope, Atkinson et al. 2002), and by viruses such as the Epstein-Barr virus (Eliopoulos, Caamano et al. 2003). The third signaling pathway is classified as “atypical” because it is independent of IKK proteins but it still requires the proteasome and is triggered by DNA damage such as UV oxidative stress (Imbert, Rupec et al. 1996; Tergaonkar, Bottero et al. 2003). However, recent data suggest another role for $\text{IKK}\alpha$ in NF- κB dependent gene expression in response to cytokine treatment (Anest, Hanson et al. 2003; Yamamoto, Verma et al. 2003). Independently of its previously described cytoplasmic role, $\text{IKK}\alpha$ functions in the nucleus by activating the expression of NF- κB -responsive genes after $\text{TNF-}\alpha$ stimulation. $\text{IKK}\alpha$ recruited to NF- κB -responsive promoters, interacts with the histone acetyltransferase CBP/p300 (CREB-binding protein). Then it mediates phosphorylation and subsequent acetylation of specific residues of histone H3 leading to the NF- κB binding sites accessibility. In inactivated cells, NF- κB is sequestered in the cytoplasm by the inhibitory protein I κB , which masks its nuclear localization sequence. In order to be active, NF- κB . The involvement of NF- κB was first tested by the capacity of Tat to activate the nuclear translocation of this factor by using the mobility shift technic assay. These experiments were performed with an oligonucleotide containing an NF- κB site and showed the formation of a complex with nuclear extracts of monocytes stimulated with Tat (figure 14). The observed interaction between NF- κB and the probe seems to be specific, since no complex was observed when the protein extract was incubated in the same conditions with the mutated NF- κB site (Badou and Bennasser 2000).

In agreement with the inability of this mutant to stimulate the production of IL-10, no complex was detected in these conditions. These results showed that Tat induces NF- κB activation specifically in monocytes. Then the region of Tat involved in NF- κB activation was investigated by stimulating monocytes with different GST-Tat deleted mutants. EMSA analysis showed that only, the C-terminally deleted mutants GST-Tat 1-72 and GST-Tat 1-45 activate NF- κB as the wild type GST-Tat 1-101. In contrast, no activation was observed with GST-Tat 30-72 or GST alone (figure 14). These results showed that NF- κB activation correlates with the ability of Tat and Tat mutant to mediate IL-10 production. In addition the role of NF- κB activation in the production of IL-10 was evaluated. Monocytes were treated with non toxic doses of TLCK (an inhibitor of NF- κB pathways), and then stimulated with Tat at 10 nM. Then, NF- κB activation and IL-10 production were analyzed by EMSA and ELISA respectively. In this conditions no NF- κB activation nor IL-10 production were obtained. Thus, Tat activates transcriptional factor NF- κB , one of the substrates of PKC, thereby causing induction of IL-10 gene.

Three distinct NF- κB activating pathways have emerged. Interestingly by using the same approach we showed that Tat protein is also able to stimulate the nuclear translocation of p52 in addition of p65 (figure 15). This results suggest that Tat protein activates both classical and alternative NF- κB pathways, while $\text{TNF-}\alpha$ activates only the classical pathway. The critical event in initiating this pathway is activation of an I κB -phosphorylating protein kinase, $\text{IKK}\beta/\text{IKK2}$, which occurs within the “IKK signalosome”, in association with a

structurally homologous kinase, IKK α /IKK1, and an adaptor protein, IKK γ /NEMO (Yamaoka, Courtois et al. 1998). IKK β -mediated phosphorylation of I κ B α leads to its proteasomal degradation and, hence, activation of its associated NF- κ B dimers that translocate in the nucleus. This pathway is normally triggered in response to microbial and viral infections or exposure to pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor TNF- α . By contrast, the “alternative” pathway, occurs independently of IKK β or NEMO, but is dependent on NF- κ B inducing kinase and IKK α . Activation of this pathway leads to a limited proteasomal processing of the NF- κ B 2/p100 precursor protein, allowing the resulting p52 fragment to translocate to the nucleus in association with some NF- κ B proteins (mainly RelB).

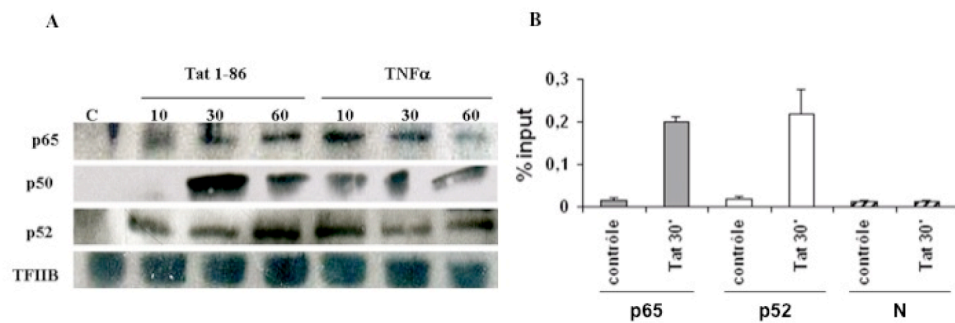


Nuclear protein extracts of human monocytes treated with wild type GST-Tat 1-101 or Tat deleted mutants or negatif control GST at 10 nM for 16 h were incubated with a ³²P-labeled NF- κ B probe sequence containing the wild type NF- κ B site. To verify that NF- κ B activation was specifically mediated by Tat, monocytes were treated with chemically mutated Tat (oxidized Tat), and nuclear extracts were analyzed by EMSA.

Fig. 14. Activation of NF- κ B by HIV-1 Tat 1-45 in human monocytes.

The analysis of signaling pathways allowed to demonstrate the crucial role of NF- κ B transactivation factor as showed by the capacity of Tat to activate the nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B which is shown to be required for the IL-10 production (Badou and Bennasser 2000). At the light of the known mechanisms of NF- κ B activation pathways, the molecular mechanisms recruited by Tat to activate NF- κ B was further investigated. To this end, and in order to use transfection approach, we have developed and validated the U937 promonocytic cells as model, in addition to primary human monocytes. Treated in the same conditions as primary human monocytes, U937 monocytic cells produced IL-10 (Leghmari and Bennasser 2008; Contreras 2008). U937 promonocytic cells previously cotransfected with a NF- κ B reporter plasmid, pNF- κ BLuc, expressing the luciferase gene under the control of four NF- κ B sites and the pCMV- β Gal, expressing the β -galactosidase gene under the control of the CMV promoter were treated by different concentrations of Tat. The obtained results showed that Tat protein is able to activate NF- κ B

in a dose dependent manner. In agreement with the data obtained in primary human monocytic cells, only, the totally Tat protein or its N-terminal fragment Tat 1-45 are able to activate NF- κ B. In contrast no activation was observed with Tat 30-72 or with GST alone (Figure 13, 14).



Tat induces recruitment of p65 and p52 to the IL-10 promoter. (A) Primary monocytes (107 cells) were stimulated or not with Tat 1-86 (10 nM) or TNF- α (20 ng/ml). Nuclear extracts were prepared and analyzed by Western blot. Anti-TFIIB was used as a loading control. (B) Monocytes were treated or not with 10nM Tat 1-86 for 30 min, and ChIP assays were performed with anti-p65, anti-p52 or without (N) antibodies. The proportion of co-immunoprecipitated IL-10 promoter was analyzed by quantitative realtime PCR.

Fig. 15. Tat activates classical and alternative NF- κ B pathways.

Using negative transdominant mutants of NIK, IKK α and IKK β , we showed that their expression inhibit strongly NF- κ B activation induced by Tat. Interestingly when both IKK α and IKK β are inhibited simultaneously by their corresponding negative transdominants, NF- κ B activation was totally inhibited. In summury our data indicate that Tat induced NF- κ B activation requires NIK, IKK α and IKK β kinases.

To adress the question whether Tat was also able to induce nuclear translocation of IKK α , nuclear extracts from Tat treated cells was analysed by SDS-PAGE and western blot using antibodies specific to IKK α . This analysis clearly showed that Tat protein is able to stimulate IKK α translocation from the cytoplasm to the nucleus. This activation is also obtained with wild type Tat protein and its N-terminal fragment but not with Tat 30-72. However, recent data suggest another role for IKK α in NF- κ B dependent gene expression in response to cytokine treatment. Independently of its previously described cytoplasmic role, IKK α functions in the nucleus by activating the expression of NF- κ B-responsive genes after TNF- α stimulation. IKK α recruited to NF- κ B-responsive promoters, interacts with the histone acetyltransferase CBP/p300 (CREB-binding protein). Then it mediates phosphorylation and subsequent acetylation of specific residues of histone H3 leading to the NF- κ B binding sites accessibility.

In summury, Tat protein secreted by infected cells will be taken up by neighboring cells to activate HIV-1 replication in HIV-1 infected latent cells, and also to activate non infected cells to produce different chemokines and cytokines including IL-10 a highly immunosuppressive cytokine greatly implicated in the dysregulation of the immune system in HIV-1 infected patients. The analysis of the signaling pathway activated by Tat underlined the crucial role of PKC and NF- κ B pathways.

3. Conclusion

HIV-1 infection hijacks the cellular machinery and uses cellular signaling pathways to its own advantage. Early secreted Tat protein, as gp120 via its interaction with CD4 receptor and CCR5 coreceptor, trigger a signaling cascade which activates calcium and protein kinase C pathways (Contreras 2008; Sieczkarski S et al. 2003). All these signaling pathways regulate cell activation by acting on the state of cell differentiation, transcription activation, cell survival or cytoskeleton dynamics which are required for viral replication (Lamph et al 1988; Burnette et al 1993; Llewellyn et al 2006).

Among the activated pathways, PKC pathway plays a critical role for HIV-1 replication. Indeed, PKCs stimulate NF- κ B (Meichle et al 1990; Junttila et al. 2003; Taunton et al. 2001) via the phosphorylation of I κ B. NF- κ B binds to the HIV promoter and is involved in initiation and elongation of transcription. In addition, PKCs activate other transcription factors like AP-1 and NF-AT, which have specific binding sites on the HIV-1 promoter. Thus, activation of PKCs can reverse HIV-1 latency in infected T cells and in cell lines (Guy et al. 1987). Moreover, PKCs have been suggested to phosphorylate a number of viral proteins such as p17 Gag (Yang et al. 1999), Nef (Popik et al. 1998; Ghosh et al. 1990; Hamamoto et al. 1990) and Rev (Fantuzzi et al. 2000). The PKC pathway is also critical for the step of entry of a number of enveloped viruses like rhabdoviruses, alphaviruses and herpesviruses (Yang et al 1999) and for type 2 adenovirus (Owen et al. 1996). Thus, the understanding of the signaling pathways implicated in the stimulation of virus replication or in the production of immunopathogenic cytokines may suggest possible targeted therapeutic approaches to neutralize such key steps.

Taking into account the role of Tat protein in viral replication and induction of immunological and neurological disorders, this Tat protein represents a potential vaccine candidate (Caputo, Gavioli et al. 2009). Tat protein appears to be an effective candidate to include for an HIV vaccine, since its gene product is produced early during the viral life cycle. Targeting the immune responses against Tat which plays an important role in viral infectivity and pathogenicity could aid in lowering the viral load through the destruction of HIV-1 replicating cells by CTL or antibody dependent cell-cytotoxicity. It is important to underline the critical role of HIV-1 Tat in the dysregulation of the immune system by the induction of the highly immunosuppressive cytokine: IL-10 (Badou and Bennisasser 2000). Interestingly several reports showed that humoral or cellular responses against Tat are associated with the control of HIV-1 infection as showed by the low viral load and the protection against AIDS progression (Wieland et al 1990; Krone et al. 1988; Reiss 1990; Re 1996; Rezza et al. 2005; Zagury et al. 1998). In agreement with these observations the group of Ensoli showed that vaccination of macaque with native Tat protein allowed protection against viral infection and disease development (Cafaro et al. 1999; Maggiorella et al. 2004). However, experiments performed by other groups showed no protection, or only a partial protection in rhesus macaques immunized with native or denatured Tat protein (Allen et al. 2002; Silvera et al. 2002; Goldstein et al. 2000; Pauza et al. 2000). This apparent discrepancy may be related to the nature of animal used cynomolgus versus rhesus and the nature of the virus used for the challenge, SHIV89.6P, SIVmac239 or SHIV33.

It is interesting to note that a therapeutic phase I clinical trial in human, using recombinant Tat protein as vaccine candidate is under investigation by the group of Ensoli.

4. References

- Albini, A., R. Benelli, et al. (1996). "HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor." *Oncogene* 12(2): 289-97.
- Albini, A., R. Soldi, et al. (1996). "The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells." *Nat Med* 2(12): 1371-5.
- Ameglio, F., M. R. Capobianchi, et al. (1994). "Recombinant gp120 induces IL-10 in resting peripheral blood mononuclear cells; correlation with the induction of other cytokines." *Clin Exp Immunol* 95(3): 455-8.
- Anest, V., J. L. Hanson, et al. (2003). "A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression." *Nature* 423(6940): 659-63.
- Ankel, H., M. R. Capobianchi, et al. (1994). "Interferon induction by HIV glycoprotein 120: role of the V3 loop." *Virology* 205(1): 34-43.
- Aoki, Y. and G. Tosato (2004). "HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity." *Blood* 104(3): 810-4.
- Badou, A., Y. Bennasser, et al. (2000). "Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway." *J Virol* 74(22): 10551-62.
- Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1996). "NF-kappa B: ten years after." *Cell* 87(1): 13-20.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." *Annu Rev Immunol* 14: 649-83.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* 220(4599): 868-71.
- Bayer, P., M. Kraft, et al. (1995). "Structural studies of HIV-1 Tat protein." *J Mol Biol* 247(4): 529-35.
- Bennasser, Y., A. Badou, et al. (2002). "Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF-alpha." *Virology* 303(1): 174-80.
- Bennasser, Y. and E. Bahraoui (2002). "HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta." *Faseb J* 16(6): 546-54.
- Berkhout, B., R. H. Silverman, et al. (1989). "Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target." *Cell* 59(2): 273-82.
- Bernstein, H. B., S. P. Tucker, et al. (1995). "Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41." *J Virol* 69(5): 2745-50.
- Bezzi, P., G. Carmignoto, et al. (1998). "Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes." *Nature* 391(6664): 281-5.
- Bonnet, F., E. Balestre, et al. (2006). "Factors associated with the occurrence of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy: Aquitaine Cohort, France." *Clin Infect Dis* 42(3): 411-7.
- Bour, S., R. Geleziunas, et al. (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection." *Microbiol Rev* 59(1): 63-93.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." *Nat Med* 12(12): 1365-71.
- Brigino, E., S. Haraguchi, et al. (1997). "Interleukin 10 is induced by recombinant HIV-1 Nef protein involving the calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase signal transduction pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3178-82.

- Burke, B., N. R. Derby, et al. (2006). "Viral evolution in macaques coinfecting with CCR5- and CXCR4-tropic SHIVs in the presence or absence of vaccine-elicited anti-CCR5 SHIV neutralizing antibodies." *Virology* 355(2): 138-151.
- Burnette, B., G. Yu, et al. (1993). "Phosphorylation of HIV-1 gag proteins by protein kinase C." *J Biol Chem* 268(12): 8698-8703.
- Cafaro, A., A. Caputo, et al. (1999). "Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine." *Nat Med* 5(6): 643-650.
- Cannell, L. J., J. E. Taunton, et al. (2001). "A randomised clinical trial of the efficacy of drop squats or leg extension/leg curl exercises to treat clinically diagnosed jumper's knee in athletes: pilot study." *Br J Sports Med* 35(1): 60-64.
- Capobianchi, M. R., C. Barresi, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 gp120 stimulates cytomegalovirus replication in monocytes: possible role of endogenous interleukin-8." *J Virol* 71(2): 1591-7.
- Caputo, A., R. Gavioli, et al. (2009). "HIV-1 Tat-based vaccines: an overview and perspectives in the field of HIV/AIDS vaccine development." *Int Rev Immunol* 28(5): 285-334.
- Chambers, P., C. R. Pringle, et al. (1990). "Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins." *J Gen Virol* 71 (Pt 12): 3075-80.
- Chan, D. C., D. Fass, et al. (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." *Cell* 89(2): 263-73.
- Chazal, N. and D. Gerlier (2003). "Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts." *Microbiol Mol Biol Rev* 67(2): 226-37, table of contents.
- Clavel, F., D. Guetard, et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." *Science* 233(4761): 343-6.
- Clerici, M. and G. M. Shearer (1993). "A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection." *Immunol Today* 14(3): 107-11.
- Clerici, M., T. A. Wynn, et al. (1994). "Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus." *J Clin Invest* 93(2): 768-75.
- Clifford, K. S. and M. F. Demierre (2005). "Progression of classic Kaposi's sarcoma with rituximab." *J Am Acad Dermatol* 53(1): 155-7.
- Conant, K., A. Garzino-Demo, et al. (1998). "Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3117-21.
- Connor, R. I., K. E. Sheridan, et al. (1997). "Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals." *J Exp Med* 185(4): 621-8.
- Contreras, X., Y. Bennasser, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production." *Virology* 332(1): 316-28.
- Coope, H. J., P. G. Atkinson, et al. (2002). "CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52." *Embo J* 21(20): 5375-85.
- Coopman, S. A., R. A. Johnson, et al. (1993). "Cutaneous disease and drug reactions in HIV infection." *N Engl J Med* 328(23): 1670-4.
- Coovadia, H. M., N. C. Rollins, et al. (2007). "Mother-to-child transmission of HIV-1 infection during exclusive breastfeeding in the first 6 months of life: an intervention cohort study." *Lancet* 369(9567): 1107-16.

- Dalglish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." *Nature* 312(5996): 763-7.
- Dean, M., M. Carrington, et al. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." *Science* 273(5283): 1856-62.
- Dejardin, E., N. M. Droin, et al. (2002). "The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways." *Immunity* 17(4): 525-35.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." *Nature* 381(6584): 667-73.
- Eliopoulos, A. G., J. H. Caamano, et al. (2003). "Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signaling pathway." *Oncogene* 22(48): 7557-69.
- Emerman, M. and M. H. Malim (1998). "HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology." *Science* 280(5371): 1880-4.
- Ensoli, B., L. Buonaguro, et al. (1993). "Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation." *J Virol* 67(1): 277-87.
- Fantuzzi, L., L. Conti, et al. (2000). "Regulation of chemokine/cytokine network during in vitro differentiation and HIV-1 infection of human monocytes: possible importance in the pathogenesis of AIDS." *J Leukoc Biol* 68(3): 391-399.
- Fauci, A. S. (1988). "The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis." *Science* 239(4840): 617-22.
- Fauci, A. S. (1996). "Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease." *Nature* 384(6609): 529-34.
- Fenouillet, E., B. Clerget-Raslain, et al. (1989). "Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis." *J Exp Med* 169(3): 807-22.
- Foucault, M., K. Mayol, et al. (2010). "UV and X-ray structural studies of a 101-residue long Tat protein from a HIV-1 primary isolate and of its mutated, detoxified, vaccine candidate." *Proteins* 78(6): 1441-56.
- Francis, M. L. and M. S. Meltzer (1993). "Induction of IFN-alpha by HIV-1 in monocyte-enriched PBMC requires gp120-CD4 interaction but not virus replication." *J Immunol* 151(4): 2208-16.
- Furrer, H., M. Opravil, et al. (2001). "Discontinuation of primary prophylaxis in HIV-infected patients at high risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia: prospective multicentre study." *Aids* 15(4): 501-7.
- Futaki, S., T. Suzuki, et al. (2001). "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery." *J Biol Chem* 276(8): 5836-40.
- Ganju, R. K., N. Munshi, et al. (1998). "Human immunodeficiency virus tat modulates the Flk-1/KDR receptor, mitogen-activated protein kinases, and components of focal adhesion in Kaposi's sarcoma cells." *J Virol* 72(7): 6131-7.
- Gao, K., R. J. Gorelick, et al. (2003). "Cofactors for human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration in vitro." *J Virol* 77(2): 1598-603.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* 100(5): 587-97.

- Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, et al. (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." *Cell* 100(5): 575-85.
- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.
- Giunta, B., D. Obregon, et al. (2006). "EGCG mitigates neurotoxicity mediated by HIV-1 proteins gp120 and Tat in the presence of IFN-gamma: role of JAK/STAT1 signaling and implications for HIV-associated dementia." *Brain Res* 1123(1): 216-25.
- Graziosi, C., K. R. Gant, et al. (1996). "Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 4386-91.
- Gringhuis, S. I., M. van der Vlist, et al. (2010). "HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells." *Nat Immunol* 11(5): 419-26.
- Grivel, J. C. and L. B. Margolis (1999). "CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue." *Nat Med* 5(3): 344-6.
- Gutheil, W. G., M. Subramanyam, et al. (1994). "Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14): 6594-8.
- Guy, B., M. P. Kieny, et al. (1987). "HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product." *Nature* 330(6145): 266-269.
- Hamamoto, Y., T. Matsuyama, et al. (1990). "Augmentation of cytotoxic effect of tumor necrosis factor on human immunodeficiency virus-infected cells by staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor." *Cancer Res*
- Harrich, D., J. Garcia, et al. (1989). "Role of SP1-binding domains in in vivo transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat." *J Virol* 63(6): 2585-91.
- Hatada, E., S. Saito, et al. (1999). "Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells." *J Virol* 73(3): 2425-33.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, et al. (1989). "An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2." *Nature* 339(6223): 389-92.
- Hoglund, S., A. Ohagen, et al. (1994). "Role of vif during packing of the core of HIV-1." *Virology* 201(2): 349-55.
- Huang, Y., W. A. Paxton, et al. (1996). "The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression." *Nat Med* 2(11): 1240-3.
- Imbert, V., R. A. Rupec, et al. (1996). "Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha." *Cell* 86(5): 787-98.
- Jeang, K. T., H. Xiao, et al. (1999). "Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat." *J Biol Chem* 274(41): 28837-40.
- Johri, M. K., R. Mishra, et al. (2011). "Tits and bits of HIV Tat protein." *Expert Opin Biol Ther* 11(3): 269-83.
- Junttila, I., R. P. Bourette, et al. (2003). "M-CSF induced differentiation of myeloid precursor cells involves activation of PKC-delta and expression of Pkare." *J Leukoc Biol* 73(2): 281-288.
- Kilby, J. M., S. Hopkins, et al. (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." *Nat Med* 4(11): 1302-7.
- Kozak, S. L., J. M. Heard, et al. (2002). "Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus." *J Virol* 76(4): 1802-15.

- Kozak, S. L., E. J. Platt, et al. (1997). "CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* 71(2): 873-82.
- Kromdijk, W., A. D. Huitema, et al. (2010). "Treatment of HIV infection with the CCR5 antagonist maraviroc." *Expert Opin Pharmacother* 11(7): 1215-23.
- Krone, W. J., C. Debouck, et al. (1988). "Natural antibodies to HIV-tat epitopes and expression of HIV-1 genes in vivo." *J Med Virol* 26(3): 261-270.
- Kronke, M., S. Schutze, et al. (1990). "Tumour necrosis factor signal transduction." *Cell Signal* 2(1): 1-8.
- Kutsch, O., J. Oh, et al. (2000). "Induction of the chemokines interleukin-8 and IP-10 by human immunodeficiency virus type 1 tat in astrocytes." *J Virol* 74(19): 9214-21.
- Kwon, D. S., G. Gregorio, et al. (2002). "DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection." *Immunity* 16(1): 135-44.
- Lee, M. R., W. Duan, et al. (2008). "Protein kinase C isozymes as potential therapeutic targets in immune disorders." *Expert Opin Ther Targets* 12(5): 535-52.
- Lamph, W. W., P. Wamsley, et al. (1988). "Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA." *Nature* 334(6183): 629-631.
- Leghmari, K., Y. Bennasser, et al. (2008). "HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways." *Eur J Cell Biol* 87(12): 947-62.
- Leghmari, K., Y. Bennasser, et al. (2008). "HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase." *Cell Immunol* 253(1-2): 45-53.
- Leghmari, K., X. Contreras, et al. (2008). "HIV-1 Tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages: differential implication of PKC-betaII and -delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38." *Cell Immunol* 254(1): 46-55.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." *Nat Rev Immunol* 2(10): 725-34.
- Li, W., G. Li, et al. (2009). "Role of Tat protein in HIV neuropathogenesis." *Neurotox Res* 16(3): 205-20.
- Lipton, S. A. and H. E. Gendelman (1995). "Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome." *N Engl J Med* 332(14): 934-40.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* 86(3): 367-77.
- Llewellyn, N., R. Zioni, et al. (2006). "Continued evolution of HIV-1 circulating in blood monocytes with antiretroviral therapy: genetic analysis of HIV-1 in monocytes and CD4+ T cells of patients with discontinued therapy." *J Leukoc Biol* 80(5): 1118-1126.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, et al. (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." *Cell* 47(3): 333-48.
- Maggiorella, M. T., S. Baroncelli, et al. (2004). "Long-term protection against SHIV89.6P replication in HIV-1 Tat vaccinated cynomolgus monkeys." *Vaccine* 22(25-26): 3258-3269.
- Markowitz, M., H. Mohri, et al. (2005). "Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report." *Lancet* 365(9464): 1031-8.

- Martinson, J. A., C. J. Montoya, et al. (2010). "Chloroquine modulates HIV-1-induced plasmacytoid dendritic cell alpha interferon: implication for T-cell activation." *Antimicrob Agents Chemother* 54(2): 871-81.
- McCutchan, F. E. (2000). "Understanding the genetic diversity of HIV-1." *Aids* 14 Suppl 3: S31-44.
- McMichael, A. J., P. Borrow, et al. "The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development." *Nat Rev Immunol* 10(1): 11-23.
- Medina, I., S. Ghose, et al. (1999). "Mobilization of intracellular calcium stores participates in the rise of $[Ca^{2+}]_i$ and the toxic actions of the HIV coat protein GP120." *Eur J Neurosci* 11(4): 1167-78.
- Meichle, A., S. Schutze, et al. (1990). "Protein kinase C-independent activation of nuclear factor kappa B by tumor necrosis factor." *J Biol Chem* 265(14): 8339-8343.
- Moore, K. W., A. O'Garra, et al. (1993). "Interleukin-10." *Annu Rev Immunol* 11: 165-90.
- Nath, A., N. J. Haughey, et al. (2000). "Synergistic neurotoxicity by human immunodeficiency virus proteins Tat and gp120: protection by memantine." *Ann Neurol* 47(2): 186-94.
- Nixon, D. E. and A. L. Landay (2010). "Biomarkers of immune dysfunction in HIV." *Curr Opin HIV AIDS* 5(6): 498-503.
- Owen, P. J., G. D. Johnson, et al. (1996). "Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells." *Exp Cell Res* 225(2): 366-373.
- Ozdener, H. (2005). "Molecular mechanisms of HIV-1 associated neurodegeneration." *J Biosci* 30(3): 391-405.
- Patella, V., G. Florio, et al. (2000). "HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human Fc epsilon RI+ cells through interaction with the VH3 region of IgE." *J Immunol* 164(2): 589-95.
- Pauza, C. D., P. Trivedi, et al. (2000). "Vaccination with tat toxoid attenuates disease in simian/HIV-challenged macaques." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3515-3519.
- Peeters, M. and P. M. Sharp (2000). "Genetic diversity of HIV-1: the moving target." *Aids* 14 Suppl 3: S129-40.
- Perry, C. M. "Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection." *Drugs* 70(9): 1189-213.
- Peterlin, B. M. and D. H. Price (2006). "Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb." *Mol Cell* 23(3): 297-305.
- Peterlin, B. M. and D. Trono (2003). "Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication." *Nat Rev Immunol* 3(2): 97-107.
- Piot, P., R. G. Feachem, et al. (2004). "Public health. A global response to AIDS: lessons learned, next steps." *Science* 304(5679): 1909-10.
- Platt, E. J., K. Wehrly, et al. (1998). "Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* 72(4): 2855-64.
- Popik, W., J. E. Hesselgesser, et al. (1998). "Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway." *J Virol* 72(8): 6406-6413.
- Pyakurel, P., F. Pak, et al. (2007). "KSHV/HHV-8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development." *Infect Agent Cancer* 2: 4.
- Quinn, T. C. (1997). "Acute primary HIV infection." *Jama* 278(1): 58-62.
- Rayne, F., S. Debaisieux, et al. (2010). "Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells." *Embo J* 29(8): 1348-62.

- Re, M. C., G. Furlini, et al. (1996). "Antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat protein may have influenced the progression of AIDS in HIV-1-infected hemophiliac patients." *Clin Diagn Lab Immunol* 3(2): 230-232.
- Reiss, P., J. M. Lange, et al. (1990). "Speed of progression to AIDS and degree of antibody response to accessory gene products of HIV-1." *J Med Virol* 30(3): 163-168.
- Rezza, G., V. Fiorelli, et al. (2005). "The presence of anti-Tat antibodies is predictive of long-term nonprogression to AIDS or severe immunodeficiency: findings in a cohort of HIV-1 seroconverters." *J Infect Dis* 191(8): 1321-1324.
- Rhodes, R. E., A. D. Martin, et al. (2001). "Temporal relationships of self-efficacy and social support as predictors of adherence in a 6-month strength-training program for older women." *Percept Mot Skills* 93(3): 693-703.
- Rinaldo, C. R., Jr., J. A. Armstrong, et al. (1990). "Relation of alpha and gamma interferon levels to development of AIDS in homosexual men." *J Exp Pathol* 5(3): 127-32.
- Robinson, J. M., J. L. Cook, et al. (2001). "The VISA-A questionnaire: a valid and reliable index of the clinical severity of Achilles tendinopathy." *Br J Sports Med* 35(5): 335-341.
- Rubartelli, A., A. Poggi, et al. (1998). "HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons." *Immunol Today* 19(12): 543-5.
- Sabatier, J. M., B. Clerget-Raslain, et al. (1989). "Use of synthetic peptides for the detection of antibodies against the nef regulating protein in sera of HIV-infected patients." *Aids* 3(4): 215-20.
- Said, E. A., F. P. Dupuy, et al. (2010). "Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection." *Nat Med* 16(4): 452-9.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." *Nature* 382(6593): 722-5.
- Sassone-Corsi, P., L. J. Ransone, et al. (1988). "Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain." *Nature* 336(6200): 692-695.
- Scarlatti, G., E. Tresoldi, et al. (1997). "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression." *Nat Med* 3(11): 1259-65.
- Schols, D. and E. De Clercq (1996). "Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production." *J Virol* 70(8): 4953-60.
- Schuitemaker, H., M. Koot, et al. (1992). "Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus population." *J Virol* 66(3): 1354-60.
- Schulz, P., V. Arbusow, et al. (1998). "Highly variable distribution of HSV-1-specific DNA in human geniculate, vestibular and spiral ganglia." *Neurosci Lett* 252(2): 139-42.
- Shankarappa, R., J. B. Margolick, et al. (1999). "Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* 73(12): 10489-502.
- Shi, B., J. Raina, et al. (1998). "Neuronal apoptosis induced by HIV-1 Tat protein and TNF-alpha: potentiation of neurotoxicity mediated by oxidative stress and implications for HIV-1 dementia." *J Neurovirol* 4(3): 281-90.

- Shojania, S. and J. D. O'Neil (2006). "HIV-1 Tat is a natively unfolded protein: the solution conformation and dynamics of reduced HIV-1 Tat-(1-72) by NMR spectroscopy." *J Biol Chem* 281(13): 8347-56.
- Sieczkarski, S. B., H. A. Brown, et al. (2003). "Role of protein kinase C betaII in influenza virus entry via late endosomes." *J Virol* 77(1): 460-469.
- Silvera, P., M. W. Richardson, et al. (2002). "Outcome of simian-human immunodeficiency virus strain 89.6p challenge following vaccination of rhesus macaques with human immunodeficiency virus Tat protein." *J Virol* 76(8): 3800-3809.
- Simpson, D. M. and M. Tagliati (1994). "Neurologic manifestations of HIV infection." *Ann Intern Med* 121(10): 769-85.
- Singh, A. and R. G. Collman (2000). "Heterogeneous spectrum of coreceptor usage among variants within a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 primary-isolate quasispecies." *J Virol* 74(21): 10229-35.
- Sirianni, M. C., L. Vincenzi, et al. (1998). "gamma-Interferon production in peripheral blood mononuclear cells and tumor infiltrating lymphocytes from Kaposi's sarcoma patients: correlation with the presence of human herpesvirus-8 in peripheral blood mononuclear cells and lesional macrophages." *Blood* 91(3): 968-76.
- So, Y. T., D. M. Holtzman, et al. (1988). "Peripheral neuropathy associated with acquired immunodeficiency syndrome. Prevalence and clinical features from a population-based survey." *Arch Neurol* 45(9): 945-8.
- Sodroski, J., C. Rosen, et al. (1985). "Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat." *Science* 227(4683): 171-3.
- Spitaler, M. et D. A. Cantrell (2004). "Protein kinase C and beyond." *Nature Rev. Immunology* 5, 785 - 790.
- Stylianou, E., P. Aukrust, et al. (1999). "IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy." *Clin Exp Immunol* 116(1): 115-20.
- Takizawa, T., K. Ohashi, et al. (1996). "Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection." *J Virol* 70(11): 8128-32.
- Tergaonkar, V., V. Bottero, et al. (2003). "IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy." *Mol Cell Biol* 23(22): 8070-83.
- Tornatore, C., A. Nath, et al. (1991). "Persistent human immunodeficiency virus type 1 infection in human fetal glial cells reactivated by T-cell factor(s) or by the cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta." *J Virol* 65(11): 6094-100.
- Tran, T. A., M. G. de Goer de Herve, et al. (2008). "Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy." *PLoS One* 3(10): e3305.
- Vendeville, A., F. Rayne, et al. (2004). "HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses." *Mol Biol Cell* 15(5): 2347-60.
- Viatour, P., M. P. Merville, et al. (2005). "Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation." *Trends Biochem Sci* 30(1): 43-52.
- Watkins, J. D., G. R. Campbell, et al. (2008). "Homonuclear 1H NMR and circular dichroism study of the HIV-1 Tat Eli variant." *Retrovirology* 5: 83.
- Westendorp, M. O., R. Frank, et al. (1995). "Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120." *Nature* 375(6531): 497-500.

- Wieland, U., J. E. Kuhn, et al. (1990). "Antibodies to recombinant HIV-1 vif, tat, and nef proteins in human sera." *Med Microbiol Immunol* 179(1): 1-11.
- Xiao, G., E. W. Harhaj, et al. (2001). "NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100." *Mol Cell* 7(2): 401-9.
- Xiao, H., C. Neuveut, et al. (2000). "Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11466-71.
- Yamamoto, Y., U. N. Verma, et al. (2003). "Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression." *Nature* 423(6940): 655-9.
- Yamaoka, S., G. Courtois, et al. (1998). "Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation." *Cell* 93(7): 1231-40.
- Yang, X., Y. Chen, et al. (1999). "ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB." *J Biol Chem* 274(39): 27981-27988.
- Yang, X. and D. Gabuzda (1999). "Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway." *J Virol* 73(4): 3460-3466.
- Zagury, J. F., A. Sill, et al. (1998). "Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine." *J Hum Virol* 1(4): 282-292.
- Zink, W. E., J. Zheng, et al. (1999). "The neuropathogenesis of HIV-1 infection." *FEMS Immunol Med Microbiol* 26(3-4): 233-41.

CONCLUSION / DISCUSSION

Le VIH, tout comme de nombreux virus, est capable de déjouer le contrôle par le système immunitaire innée et adaptatif mis en place pour défendre l'organisme. En effet, le VIH, par ses nombreuses protéines virales, est capable d'interagir avec divers composés cellulaires afin de les inhiber ou de les détourner à son profit. De façon générale, le VIH comme d'autres virus, détourne la production des cytokines afin d'échapper au système immunitaire et persister dans l'hôte (50, 61, 62, 70, 82, 91-93, 272-274, 336-342). En effet, chez les patients infectés par le VIH-1, on observe dès le stade asymptomatique une dérégulation du système immunitaire. Plus particulièrement, on observe une perturbation du réseau de cytokines au profit d'une réponse de type Th2, humorale et inefficace dans la lutte contre le virus (74, 75, 337, 343). C'est ainsi que chez les patients infectés, la production de TNF- α et d'IL-10, participe activement à l'hyperactivation chronique et l'affaiblissement du système immunitaire associé à la progression de la maladie vers la phase SIDA. De nombreux travaux définissent l'hyperactivation du système immunitaire comme un facteur révélant la progression de la maladie vers la phase SIDA (69, 70, 172, 177). En effet, cette hyperactivation, due aux cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , est associée à une importante perte des lymphocytes T du tractus gastro-intestinal et à la destruction de la barrière gastro-intestinale. Ceci a pour conséquences la translocation de produits microbiens au niveau systémique, la dérégulation du réseau de cytokines et par conséquent: l'activation des réservoirs, la réplication virale et l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. De façon intéressante, cette hyperactivation du système immunitaire est aussi accompagnée d'une immunosuppression chez les patients infectés. Différents travaux semblent montrer une association entre le taux d'IL-10 et l'évolution de la maladie. Chez les patients atteints par le VIH-1, la mutation 592A/C au niveau du promoteur de l'IL-10 est associée à l'évolution de la maladie vers le SIDA. Au contraire, les patients homozygotes 592C+/+ évoluent moins rapidement vers ce stade. De plus, les patients homozygotes ou hétérozygotes pour l'allèle 592A, développent la maladie plus rapidement (73). Ces travaux sont aussi en accord avec ceux montrant une relation directe entre la progression de la maladie et l'augmentation sérique d'IL-10 chez les patients infectés, ou la réduction de la production d'IL-10 chez les patients sous trithérapie (74, 114). Ainsi, le VIH met en place cette stratégie de dérégulation du réseau de cytokines afin de persister, se disséminer mais aussi échapper au système immunitaire de l'hôte. Étant donné que la dérégulation du réseau de cytokines est observée dès le stade asymptomatique, il ferait sûrement intervenir des facteurs viraux et cellulaires. Un des facteurs viraux étudié au laboratoire est la protéine Tat du VIH-1. Au laboratoire nous avons montré que c'est cette protéine virale Tat, produite

très précocement au cours du cycle viral, qui est essentielle à la dérégulation du réseau de cytokines. Plus particulièrement, notre laboratoire a montré que la protéine Tat, par son domaine N-Terminal 1-45, agit à la membrane des monocytes afin d'induire la production de nombreuses cytokines. En effet, nous avons montré que la protéine Tat du VIH-1 induit la production de TNF- α et d'IL-10 en agissant à la surface des monocytes humains. Nous avons aussi montré que Tat dérégule la production d'autres cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8 et l'IFN- γ par les monocytes. Du fait des propriétés de toutes ces cytokines, ceci suggère fortement qu'*in vivo*, très précocement, Tat participerait activement à la pathogenèse et à l'échappement du virus ainsi qu'à l'évolution de la maladie vers la phase SIDA.

Notre étude a mis en évidence l'implication du TLR4-MD2 dans la sécrétion de TNF- α , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et IFN- γ induite par Tat. Cette sécrétion de cytokines se fait par une interaction directe spécifique et forte du domaine 1-45 de Tat avec l'ectodomaine du TLR4-MD2. Nous avons aussi montré que Tat par son domaine 1-45 active le complexe TLR4-MD2 à la surface des cellules. Cette activation se traduit par la translocation du complexe Tat-TLR4-MD2-CD14 aux rafts suivi de l'internalisation dynamine dépendante de ce dernier. Cette activation et internalisation sont essentielles à l'induction de la signalisation et la synthèse de cytokines induites par Tat chez les monocytes humains. En effet, nous avons démontré l'implication du TLR4-MD2-CD14 dans la signalisation décrite pour la synthèse d'IL-10 et de TNF- α induite par Tat. Plus précisément, le complexe TLR4-MD2-CD14 est indispensable à l'activation des MAP kinases p38, ERK1/2, de la PKC- β II et du facteur de transcription NF- κ B induits par Tat chez les monocytes primaires. En outre nous avons montré que Tat utilise/détourne les voies Myd88 dépendante et TRIF dépendante du TLR4, afin d'activer les MAP kinases et NF- κ B responsables de la production de ces cytokines. De façon intéressante, il apparaît également que Tat 1-45 détourne l'activation du TLR4 afin d'induire des régulateurs négatifs des voies de signalisation, SOCS1 et SOCS3. En effet, par l'interaction avec le TLR4-MD2, Tat, par son domaine 1-45, induit chez les monocytes et les cellules dendritiques la synthèse de SOCS1 et SOCS3. Ces protéines agissent comme des régulateurs négatifs des voies de signalisation du TLR4 mais aussi de l'IFN antiviral. Ainsi, par nos travaux nous avons démontré pour la première fois, le détournement d'un récepteur de l'immunité innée : le TLR4 par la protéine virale Tat au profit du VIH-1. Ceci permet de provoquer une dérégulation du réseau de cytokines très précocement au cours de l'infection et qui pourrait participer à l'évolution de la maladie vers la phase SIDA.

De nombreux virus utilisent et détournent la voie des TLR à leurs profits. Les TLR étant des récepteurs de l'immunité innée, responsables de la détection et l'élimination des pathogènes mais aussi l'orientation des réponses immunitaires, il apparaît essentiel pour les pathogènes de détourner voire d'inhiber leurs activations. C'est le cas notamment du virus de la rougeole qui interagit avec le TLR4 pour inhiber la synthèse d'IL-2 activatrice de l'immunité cellulaire. Ce virus peut aussi interagir avec le TLR2 pour induire l'expression de son propre récepteur d'entrée le CD150 à la surface des monocytes (296). Le cas du rétrovirus murin MMTV, est aussi intéressant dans la mesure où l'activation du TLR4 par ce virus conduit indirectement à la sécrétion d'IL-10 par les cellules B, diminuant ainsi la réponse antivirale ce qui favorise l'échappement du virus (283, 344). De façon intéressante, nous avons noté que la séquence de l'enveloppe du MMTV, qui interagit avec le TLR4, est similaire à celle des 15 premiers acides aminés de la protéine Tat du VIH-1. On peut alors penser que, comme la glycoprotéine d'enveloppe du MMTV, le domaine N-terminal de la protéine Tat serait un PAMP du TLR4. Cette reconnaissance permettrait à ces protéines virales de détourner l'activation du TLR4 afin d'induire le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8, l'IFN- γ , l'IL-10 mais aussi les régulateurs SOCS1 et SOCS3. Avec l'expression de ces cytokines et régulateurs *via* le TLR4, la protéine Tat du VIH-1 contribue à l'affaiblissement du système immunitaire et à l'échappement du virus aux mécanismes de surveillances de hôte. Tout comme le VIH, d'autres virus sont capables de détourner l'activation des TLR à leurs profits. C'est le cas du LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus), qui active les cellules gliales et la production d'IL-6 et de TNF- α par le TLR2. Cette production de cytokines contribue à l'évasion, la réplication et la dissémination du LCMV (345). Enfin, d'autres virus sont capables d'inhiber directement la transduction du signal passant par les TLR. Ceci afin d'empêcher l'activation efficace de la réponse antivirale. Par exemple, la protéine A46R du virus de la vaccine interfère avec les voies de signalisation MyD88 dépendante et indépendante par son domaine TIR (327). Elle participerait ainsi à la virulence du virus. La protéine NS5A du virus de l'hépatite C co-immunoprécipite avec MyD88 et inhibe de ce fait, la voie MyD88 dépendante dans les macrophages de souris (328). La modulation de la réponse immunitaire par NS5A du virus de l'hépatite C pourrait en partie expliquer la chronicité de l'infection caractérisée par une faible réponse des cellules T CD4 et CD8. Ces données montrent que certains virus sont capables d'échapper au système immunitaire en agissant dès la mise en place de la réponse innée, par exemple en interférant directement avec les TLR ou encore avec les voies de transduction activées par ces récepteurs. En interagissant avec le TLR4, la

protéine Tat, quant à elle, détournerait les voies de transduction du TLR pour induire directement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8. Ceci permettrait de contribuer à l'hyperactivation du système immunitaire et l'apoptose des cellules exprimant le TNFR. D'autres part, en activant l'expression des SOCS1 et SOCS3, Tat inhiberait l'action des IFN antiviraux, produits lors de la reconnaissance du virus par les cellules. Ainsi, Tat inhiberait la mise en place de l'immunité innée et préviendrait la mort des cellules infectées. En parallèle, en induisant la production d'IL-10, une cytokine immunosuppressive, Tat contribuerait à l'affaiblissement du système immunitaire et l'échappement du virus.

Nos travaux montrent plus en détails que Tat active les voies dépendantes de Myd88 et de TRIF du TLR4 pour induire l'IL-10, le TNF- α et l'IL-6. Cependant, nos travaux montrent clairement que l'activation de ces voies de signalisations nécessite l'activation du TLR4, mais aussi la présence des ses cofacteurs CD14 et MD2. De façon importante, nos travaux montrent l'importance de la translocation du complexe Tat-TLR4-CD14-MD2 aux rafts et de son internalisation dans l'activation des voies de signalisation et la production de cytokines. En effet, l'utilisation d'anticorps bloquants MD2 et/ou CD14 ne présentent que très peu d'effets sur l'inhibition de la production de cytokines par Tat. Par contre, même si Tat n'interagit pas avec le CD14, l'utilisation des modèles murins montrent l'importance de ces cofacteurs : CD14 et MD2, pour initier une signalisation et permettre la production de cytokines. Ceci peut s'expliquer principalement par le rôle important de ces cofacteurs dans le transport du TLR4 à la surface cellulaire ou leurs rôles dans l'internalisation du TLR4 activé suite à sa stimulation. En effet, la protéine MD2 est essentielle au TLR4, car elle reste indispensable à son export membranaire. De plus, récemment il a été décrit une phosphorylation de MD2 suite à la stimulation du TLR4 par le LPS. Ce MD2 phosphorylé pourrait alors être responsable de l'activation des cascades de signalisations nécessaires à l'induction des voies Myd88 et TRIF dépendante. Dans ce papier, les auteurs démontrent clairement que la phosphorylation de MD2 dépend de l'endocytose dynamine dépendante du TLR4. Ceci traduit alors l'implication d'un mécanisme complexe d'activation du TLR4 suite à la liaison du LPS. Cette étude met aussi en avant le lien encore méconnu entre l'internalisation du complexe TLR4 activé et l'initiation des voies de signalisations Myd88 et TRIF dépendante. Le CD14 est lui connu pour être responsable de l'internalisation du TLR4 activé et recruté aux rafts. Il est clairement établi par divers travaux, qu'en absence de CD14, le TLR4 ne peut être internaliser. Des études récentes montrent que la seule expression du CD14 peut permettre l'internalisation du TLR4 par les cellules mais aussi l'induction de la

signalisation TRIF dépendante (320). L'internalisation du TLR4 est importante car de nombreux travaux, dont ceux dirigés par l'équipe de Kagan, suggèrent une activation séquentielle des voies de Myd88 et TRIF dépendante (315). Dans ces travaux, il apparaît que lorsque le TLR4 est activé puis recruté aux rafts, la voie Myd88 dépendante est activée à la membrane plasmique. La seconde voie de signalisation, la voie dépendante de TRIF, se ferait plus particulièrement au niveau des endosomes. En effet, il apparaît que l'adaptateur TRAM soit localisé au niveau des endosomes précoces et nécessite une myristoylation afin d'être activé. Ainsi, en activant le TLR4, une signalisation très précoce permettrait l'invagination membranaire et l'internalisation du complexe activé. Cette signalisation précoce dépendrait du CD14, qui en retour, activerait le MD2 et permettrait d'initier la voie dépendante de Myd88. Une fois le complexe internalisé, la voie dépendante de TRIF se ferait plus tardivement au niveau des endosomes. Il serait toutefois intéressant de suivre le trafic endocytaire du TLR4 et de la protéine Tat du VIH-1, afin de connaître le « routing » de ces derniers. Plus particulièrement, afin de savoir si Tat et le TLR4 suivent une voie d'internalisation classique : endosomes, lysosomes ou bien une voie qui leurs est propre.

Nos travaux indiquent aussi que Tat utilise ces 2 voies de signalisations du TLR4 afin d'activer les MAP kinases et NF- κ B. En accord avec la littérature, les MAP kinases p38, ERK1/2 et le facteur de transcription NF- κ B ont déjà été décrits dans les signalisations du TLR4 (314). Ceci, conforte la possibilité que le VIH-1 utilise le TLR4 pour induire la synthèse d'IL-10 mais aussi des autres cytokines. Tat induit l'activation des PKC- β II et - δ pour la production d'IL-10. De nombreux travaux décrivent l'implication des PKC- ϵ , - δ , - ζ , - ι dans l'activation et la régulation des molécules de signalisation associées au TLR4 (277, 279, 280). En effet, il apparaît que la PKC- δ intervient dans la phosphorylation de l'adaptateur TIRAP, présent dans la signalisation Myd88 dépendante du TLR4. De même, des études montrent l'implication des PKC- β et - δ dans la signalisation du TLR4 (346, 347). Récemment, il a été montré que la PKC- β II intervient dans la signalisation de NF- κ B au niveau des L_B (348). Dès lors, on peut se demander si la PKC- β II intervient dans l'activation de NF- κ B suite à l'activation des TLR. L'activation des PKC dans la signalisation des TLR n'est donc pas à exclure. En aval des PKC, Tat active les MAP kinases ERK1/2 et p38, pour induire la production de cytokines par les monocytes humains (118, 266, 267). En plus de son rôle dans la production de cytokines, l'activation de la voie MAP kinase par Tat, peut avoir des effets directs sur la réplication virale et la déplétion des cellules T CD4. En effet, l'inhibition spécifique des MAP kinases p38, diminue significativement la production de particules

virales (349). Les MAP kinases semblent impliquées dans la réplication virale *via* NF- κ B, qui contribue à l'activation du LTR (350) et l'apoptose des cellules voisines infectées ou non (351). La protéine Nef du VIH-1 peut aussi activer la voie des MAP kinases. Cette dernière, active le facteur de transcription AP-1 afin de stimuler l'expression de Fas-L et induire l'apoptose des cellules infectées (352). Il serait intéressant de chercher si la protéine Tat utilise le même mécanisme pour induire l'apoptose des L_T. De manière similaire, les MAP kinases ERK1/2 semblent activer la réplication virale en induisant la transactivation du LTR, suite à l'activation des CCR5 membranaires (353). Tous ces mécanismes sont exploités par le VIH-1 afin de conduire à l'activation des voies de signalisation aboutissant à la dérégulation du réseau de cytokines, à la persistance et à l'échappement du virus au système immunitaire.

La protéine Tat du VIH-1 utilise donc les voies du TLR4 afin d'induire le TNF- α par les monocytes humains. Cette production de TNF- α est importante puisqu'elle participe activement à la réplication du virus, la réactivation des réservoirs latents mais aussi à la pathogénèse du VIH. En effet, l'utilisation du TLR4 pour la synthèse de TNF- α par les monocytes pourrait expliquer la corrélation établie entre l'augmentation de l'expression du TLR4 au niveau du SNC et la neurodégénérescence associée au VIH (354). En effet comme le LCMV, le VIH-1, par l'interaction Tat-TLR4, favoriserait la réplication virale et l'invasion du SNC. Le TNF- α produit par la protéine Tat joue aussi un rôle important dans l'apoptose des cellules exprimant TRAIL, dont les L_T. De manière intéressante, une étude comparative entre le macaque et le sooty mangabey suggère un rôle essentiel du TNF- α dans l'établissement de l'hyperactivation associée à la maladie et l'évolution vers la phase SIDA. Dans cette étude, les auteurs montrent que les monocytes de macaques produisent plus de TNF- α , en réponse à une infection, comparativement au sooty mangabey qui ne développe pas la maladie. Ceci suggère que la production de TNF- α serait à l'origine de l'hyperactivation conduisant à l'apoptose des L_T, l'affaiblissement du système immunitaire, la destruction de la barrière gastro-intestinale et l'apparition du SIDA.

De plus, nous avons montré que Tat induit la production d'IL-8 et d'IL-6 par les monocytes. Ces cytokines sont importantes car impliquées dans le chimiotactisme des cellules et l'activation du système immunitaire. Il apparaît entre autre, que la protéine Tat induit aussi la sécrétion d'IL-8 et d'IL-2 par les L_T (236). On peut alors se poser la question suivante : Tat fait-elle intervenir le TLR4 des lymphocytes pour induire ces cytokines ? Il se

pourrait que l'interaction Tat-TLR4-MD2 soit responsable de l'augmentation sérique de TNF- α , d'IL-10 mais également de la production d'IL-8 et d'IL-2. Les IL-8 et IL-2 interviendraient dans le recrutement des neutrophiles, l'activation des cellules de l'immunité et participeraient à l'invasion du VIH. De plus, l'engagement répété des TLR mène à la synthèse d'IFN- γ conduisant à l'anergie des L_T (334). Ces L_T producteurs d'IFN- γ représentent une source importante d'IL-10 au cours d'une infection virale (335). L'engagement répété des TLR au niveau des L_T serait donc responsable de l'immunosuppression. Ainsi, il se pourrait qu'au niveau des organes lymphoïdes secondaires, Tat active de manière répétée le TLR4 à la surface des monocytes et lymphocytes pour induire leurs activations chroniques provoquant par la même la synthèse de TNF- α et d'IL-10 qui participeraient activement à l'évolution de la maladie vers la phase SIDA.

De nombreux mécanismes d'échappements viraux font intervenir l'IL-10 comme stratégie d'évasion au système immunitaire. C'est le cas des Poxvirus, du HCMV et du virus Epstein-Barr qui synthétisent un homologue viral de l'IL-10 qui facilite le développement de l'infection en réprimant la réponse antivirale et l'initiation de la réponse cellulaire Th1 (355). Le LCMV, lui aussi, persiste dans l'organisme en induisant la production d'IL-10 par les DC (345). Dans l'infection au VIH-1, l'augmentation de l'IL-10 semble étroitement corrélée avec l'évolution de la maladie vers le stade SIDA [38]. En accord avec cette observation, il a été montré que les personnes produisant moins d'IL-10, à cause d'une mutation sur le promoteur de l'IL-10 (IL-10-5'-592A), évoluent moins rapidement vers le stade SIDA. Les résultats *in vitro* montrent aussi l'effet immunosuppresseur de l'IL-10 sur la capacité de prolifération des L_T suite à la stimulation par un antigène spécifique. En effet, les travaux de Clerici et *al.* et plus récemment, ceux de Brockman et *al.* ont montré que les L_T de patients asymptomatiques retrouvent leurs capacités de prolifération suite à la neutralisation de l'IL-10 (108). Notons aussi, que des travaux récents ont montré chez des souris immunisées avec la gp120 une réponse Th1 qui « switch » vers un profil Th2 lorsque les souris sont immunisées avec la gp120 et Tat. L'analyse de ces travaux a permis de montrer que ce « switch » est médié principalement par la capacité de Tat à stimuler la production d'IL-10. Ces auteurs ont pu mimer l'effet de Tat en immunisant les souris avec la gp120 en présence d'IL-10 recombinante (166).

De manière intéressante, de nombreux travaux relatent la capacité des cytokines pro-inflammatoires à induire l'expression de nombreux facteurs de régulation ou d'immunosuppression des réponses immunitaires tels que PD1/PD1L qui abouti à la

synthèse d'IL-10. En effet, il a été décrit que le VIH-1 par l'intermédiaire des TLR7/9, induit une signalisation Myd88 dépendante permettant d'augmenter directement l'expression du ligand de PD-1 : PD-1L au niveau des cellules présentatrices de l'antigène. Ceci contribue à l'anergie des L_T et à l'évolution de la maladie vers le stade SIDA (332). Plus récemment, le groupe de Sékaly a montré que la stimulation des TLR par les produits bactériens de la flore intestinale augmente l'expression de PD-1 sur les monocytes des patients séropositifs pour le VIH-1 (110). Les monocytes exprimant PD-1 interagissent avec PDL-1, à la surface des cellules et provoquent la production d'IL-10, responsable de l'affaiblissement du système immunitaire. Cette interprétation est en accord avec la restauration de la fonction des L_T CD4, suite à la neutralisation de l'interaction PD-1-PDL-1 ou IL10-IL-10R (356). De plus, des études réalisées dans le modèle macaques/sooty mangabey confirment le rôle important de l'expression de ce système dans l'évolution de la maladie. Tout comme l'homme, les macaques ne vont exprimer que très tardivement ce système PD1/PD1L. Au contraire, les sooty mangabey qui ne développent pas la maladie vont exprimer très précocement le système PD1/PD1L. Ceci permet alors de montrer que la régulation de l'hyperactivation du système immunitaire joue un rôle primordial dans l'évolution de la maladie vers la phase SIDA. Des mécanismes similaires de dysfonctionnement immuns et de persistance virale ont été décrits pour d'autres virus tels que le LCMV. En effet, la persistance dans cette infection se caractérise par une augmentation de l'expression du système PD1-PD1-L à la surface des cellules de l'immunité et une production d'IL-10 par les cellules présentatrices d'antigènes. L'utilisation d'anticorps bloquants l'interaction IL10-IL-10R, là encore, permet de restaurer une fonction T normale et entraîner la clairance virale. Ainsi, ces deux facteurs semblent jouer un rôle important dans le dysfonctionnement de la réponse immune et la persistance virale. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de la stimulation du TLR4 par Tat sur l'expression du système PD1/PDL1 *in vivo et in vitro*. Dans notre étude, le mécanisme d'échappement viral mis en évidence serait similaire à celui du MMTV (TLR4) ou de *Yersinia enterocolitica* (TLR2), c'est à dire que le VIH par sa protéine Tat utilise le TLR4 pour stimuler la synthèse d'IL-10 et favoriser l'expression de PD1/PDL1 afin d'instaurer un état immunosuppressif.

Un autre mécanisme d'affaiblissement du système immunitaire au cours d'infections virales persistantes est l'augmentation de l'expression et de l'activité de l'enzyme immunosuppressive IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase). Plusieurs travaux ont montré que cette enzyme contribue à la persistance de nombreux virus dont le rétrovirus MuLV et le VIH

(357, 358). Plus précisément, il a été montré que le VIH active l'expression d'IDO chez les monocytes, DC et pDC (359). Cette augmentation d'IDO est responsable de la dégradation du tryptophane en kynurénine, un composé neurotoxique. La déplétion du tryptophane, un acide aminé essentiel, a pour conséquence d'inhiber la prolifération lymphocytaire et la production d'IFN- γ . Ceci contribue à l'échappement du virus, la persistance virale et la pathogénèse associée à l'infection. L'un des mécanismes mis en place par le VIH pour activer l'enzyme IDO est la protéine virale Tat (264, 265). En effet, des travaux ont montré que la protéine Tat pourrait être impliquée dans la production de l'enzyme IDO. IDO a pour effets de polariser la réponse Th17 vers une réponse Treg, moins favorable pour le maintien de l'intégrité de la barrière gastro-intestinale. Cette barrière détruite, cela favoriserait la translocation de produits microbiens et de ce fait l'hyperactivation chronique et la dérégulation du système immunitaire. Il serait alors intéressant de voir ici aussi, l'implication du TLR4 dans l'augmentation d'IDO par la protéine Tat du VIH-1. Ceci afin de mieux comprendre comment la protéine Tat en interagissant avec le TLR4 pourrait moduler le profil des cytokines et influencer la spécificité de la réponse immune.

Nos travaux au laboratoire montrent aussi que Tat, par son domaine 1-45, active l'expression des régulateurs SOCS1 et SOCS3 chez les monocytes, DC et la lignée HEK-TLR4-CD14-MD2. Nos résultats sont en accord avec des travaux récents de la littérature. En effet, l'expression de SOCS3 et SOCS1 induite par la protéine Tat dans les macrophages a été précédemment décrit par Akhtar L et al (360, 361). Dans ces travaux, l'activation induite par Tat est beaucoup plus élevée dans les macaques infectés que dans les sooty mangabey qui ne développent pas le SIDA. D'autres études ont confirmé ces résultats. De plus, elles ont rapporté qu'une augmentation similaire de SOCS3 est observée chez les patients infectés par le VIH-1 (362, 363). Divers travaux ont montré la capacité de Tat à induire l'expression de SOCS2. Cependant, l'induction des SOCS par Tat semble néanmoins dépendre du type cellulaire. En effet, très peu de travaux montrent la capacité de Tat à induire simultanément SOCS1, SOCS2 et SOCS3 dans un seul type cellulaire. L'importance des SOCS dans l'évolution de l'infection peut toutefois être expliquée par le rôle de ces derniers dans la signalisation des interférons. En effet, SOCS1 et SOCS3 sont connus pour inhiber la signalisation IFN, qui elle, à pour but premier d'inhiber la réplication virale et l'infection des cellules. Ainsi, d'autres pathogènes tels que *Mycobacterium avium* et *Toxoplasma gondii* induisent respectivement l'expression des SOCS3 et SOCS1 afin d'échapper à l'effet des IFN (364, 365). Par ces

mécanismes, plusieurs virus y compris les HSV-1 et le virus de la grippe A, interfèrent avec les effets antiviraux des IFN de type I et II (366, 367).

Pour conclure, les travaux acquis dans notre équipe suggèrent pour la première fois, le rôle d'une protéine virale du VIH dans le détournement de l'activation d'un TLR à son profit. Plus précisément, nos études montrent que le VIH-1, par l'interaction de sa protéine Tat avec le TLR4 présent à la surface des monocytes: i) favorise la pathogenèse et l'hyperactivation du système immunitaire par la synthèse de TNF- α , d' IL-6 et d' IL-8 ; ii) inhibe les réponses antivirales par l'expression des SOCS1 et SOCS3 et iii) affaiblit le système immunitaire par la synthèse d'IL-10.

Différents groupes ont montré que les cytokines pro-inflammatoires semblent aussi être impliquées dans la production des facteurs de co-stimulation négatifs : PDL-1 et PD-1 [4, 62] dont l'interaction aboutit à la production d'IL-10. La protéine Tat est produite précocement dans le cycle viral et sa présence dès le stade primo-infection pourrait, bien avant la destruction de la barrière gastro-intestinale et la translocation de produits microbiens, initier l'hyperactivation du système immunitaire et aussi conduire à l'affaiblissement de ce dernier par la production d'IL-10. Il paraît donc important de comprendre le rôle des voies du TLR4 et les mécanismes moléculaires par lesquels Tat instaure un état immunosuppresseur. Il serait aussi intéressant d'explorer l'effet de la co-stimulation d'autres TLR, normalement activés suite à l'infection par le VIH-1, sur la production des cytokines, l'expression des facteurs immunosuppresseurs et la fonction des cellules dendritiques. La capacité du VIH-1 à utiliser et détourner à son profit un récepteur essentiel à la détection des agents pathogènes et à l'orientation des réponses immunitaires reste un exemple d'adaptabilité du virus et également une information importante pour l'établissement de thérapies futures.

ANNEXE



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Cationic nanoglycolipidic particles as vector and adjuvant for the study of the immunogenicity of SIV Nef protein

Nawal Ben Haij, Olfa Mzoughi, Rémi Planès, Elmostafa Bahraoui*

Unité mixte INSERM, Université Paul Sabatier 1043, CNRS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), CHU Purpan, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2011

Received in revised form 24 June 2011

Accepted 29 June 2011

Available online 6 July 2011

Keywords:

Nanoparticles

HIV-1

Nef

Antibodies

Adjuvant

Immunogenicity

ABSTRACT

The objective of this study was to test the immunogenicity of SIV Nef protein formulated in cationic nanoglycolipidic particles of 100 nm of diameter. In parallel, the adjuvant effect of these nanoglycolipidic particles was compared in similar experiments using GST-Nef in association with the commonly strongest used complete Freund's adjuvant (CFA) or incomplete Freund's adjuvant in association with MDP or MDP alone. Our results showed that these particles do not alter the integrity of our immunogen GST-Nef, which remains stable for more than three months at 4 °C. We demonstrated that in the presence of nanoglycolipidic particles antibodies against Nef were produced since the first injection and remained stable after the third injection with high titers for long lasting periods as observed with CFA and IFA/MDP adjuvant. The analysis of immunoglobulin isotype profiles of antibodies generated by the different protocols of immunization showed the preponderance of IgG1 isotypes suggesting the predominance of Th2-type immune response.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

All trials to develop an efficient vaccine against HIV have failed. The assay using soluble envelope glycoprotein gp120 (AIDS VAX gp120) allowed production of antibodies which are unable to protect human from HIV-1 infection (Pitisuttithum et al., 2006). Similarly the vaccination with recombinant adenoviruses, serotype 5, expressing Gag, Pol and Nef proteins, proved unable to control efficiently HIV-1 infection despite the production of CD8 cytotoxic immune responses (Buchbinder et al., 2008; McElrath et al., 2008). However, it is interesting to note that in a recent assay a small, but significative protection was observed for the first time in the vaccinated group when compared with the control. In this assay performed in Thailand volunteers were primo-immunized with canary pox viral vector encoding for gp120, Gag and Pol and then boosted with soluble gp120 (Rerks-Ngarm et al., 2009). Taking into account these data, the success of future vaccines will depend on the development of new immunogens, vectors and adjuvant. To this end, a deeper understanding of the immunogenicity of every viral protein, associated with various vectors and adjuvant, becomes essential.

To this end, we analyzed in this study the immunogenicity of SIV Nef protein. The *nef* gene is conserved among primate lentiviruses.

It is among the first viral gene expressed after HIV infection. This suggests a critical role for *nef* gene product in the viral cycle and therefore in the pathogenesis of HIV and simian immunodeficiency virus (SIV) infections. The *nef* gene product of HIV-1 and SIV is a cytoplasmic regulatory protein with a molecular weight of 25–27 kDa (Franchini et al., 1986; Kaminchik et al., 1994). In addition, Nef enhances viral replication in primary peripheral blood mononuclear cells *in vitro* (Baba et al., 1999; Foster and Garcia, 2008; Jere et al., 2010; Miller et al., 1994), a property shown to be a reflection of enhanced infectivity of the HIV-1 *in vivo* (Chowers et al., 1994). Nef also induces a dramatic down regulation of CD4 and MHC-I molecules from the cell (Foster and Garcia, 2008; Garcia and Miller, 1991; Guy et al., 1987; Noviello et al., 2008). This effect on CD4 expression has been proposed as a mechanism of prevention for cell super-infection and also as a viral escape mechanism (Benson et al., 1993). Various reports provide evidence that Nef alters signal transduction pathways and induces a lack of cell responsiveness when surface receptors are stimulated (Baur et al., 1994; Collette et al., 1996; De and Marsh, 1994; Fackler et al., 2007; Rudolph et al., 2009; Stolp et al., 2009). It has also been reported that Nef protein is expressed on the surface of infected human T cells and can interact with uninfected T cells via its carboxy terminal region (Otake et al., 1994; Raymond et al., 2011). However, Nef can also suppress T cells growth and thus be involved in the selective depletion of CD4+ cells in HIV infection (Daniel et al., 1992).

Moreover, Nef protein has been shown to be required for SIV pathogenicity *in vivo* (Baba et al., 1999; Kestler et al., 1991). Indeed, adult rhesus macaques, infected with SIV bearing a large deletion in *nef* gene, exhibit low viral loads and do not develop AIDS disease

* Corresponding author at: Laboratoire d'Immuno-Virologie, 118 route de Narbonne, 4R3 b2, 31062 Toulouse Cedex, France. Tel.: +33 5 61 55 86 67; fax: +33 5 61 55 86 67.

E-mail address: bahraoui@cict.fr (E. Bahraoui).

(Chakrabarti et al., 1995; Kestler et al., 1991). In addition, it has been shown in the SIV model that vaccine induced Nef specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) can control early replication after challenge of macaques by pathogenic SIV (Sinclair et al., 1997). This Nef mediated protection is related to its capacity to down regulate MHC-I expression on HIV-1 infected cells. It is also interesting to note that anti-Nef specific CTL were detected in uninfected children born from HIV infected mothers (Collins et al., 1998). Moreover, studies of long-term survivors of HIV-1 infection also indicate that Nef can be an important determinant for clinical outcome (Greene et al., 2010). In several long-term nonprogressors, the efficient control of HIV-1 infection seems to be associated with deletion in *nef* gene (Deacon et al., 1995) or with an unusual high frequency of defective alleles and functionally defective Nef protein (Mariani et al., 1996).

Thus, Nef protein appears to be an effective candidate for an HIV vaccine since it is produced early during the viral life cycle. Targeting the immune responses against Nef could aid in preventing HIV-1 infection and in controlling the viral load by blocking the first steps of viral cycle. However, it is important to generate, in addition to cellular immune response, a specific humoral immune response against Nef that can lead to the induction of anti-Nef antibodies. Those antibodies could then block membrane and extracellular activities of Nef.

The major problems in using subunit vaccines, such as a Nef vaccine, are that purified proteins are generally poorly immunogenic and alum is the single adjuvant currently approved for humans. Thus, other types of adjuvant, such as liposomes, virosomes, ISCOM, TLR ligands, cytokines and nanoparticles are under investigation. In the present work we tested the capacity of cationic nanoglycolipidic particles (NP) to enhance the antibody response against SIV GST-Nef protein.

These latter NP vectors constitute a new family of biodegradable nanoparticles. They are capable of associating with different types of immunogens. Indeed, the composition of the NP can be modified to optimize vector-immunogen association (De Miguel et al., 2000; Major et al., 1997; von Hoegen, 2001). Accordingly, several studies have used the NP as vectors associated with different viral immunogens including those of rabies (Castignolles et al., 1996), hepatitis B (Debin et al., 2002), Influenza (von Hoegen, 2001) and CMV viruses (Prieur et al., 1996). In addition to their function as vectors, these NP possess an intrinsic adjuvant effect and are compatible with both systemic and mucosal administrations (Debin et al., 2002).

In the present work we tested the capacity of NP cationic nanoglycolipidic particles to enhance the antibody response against SIV GST-Nef protein. This response will be compared with those obtained in the presence of the commonly strongest adjuvant (complete Freund's adjuvant, incomplete Freund adjuvant in association with MDP or MDP alone).

2. Material and methods

2.1. Construction, production, expression and purification of glutathione-S-transferase-Nef fusion protein (GST-Nef_{SIV mac 251})

The plasmid expressing *gst-nef_{SIV mac 251}* was constructed and produced as previously described for GST-Nef_{HIV-1LA1} (Cazeaux et al., 2002; Moureau et al., 2002) and used for transformation in competent DH5 α cells. Briefly, transformed *E. coli* DH5 α cells were grown in LB complete medium and centrifuged after 5 h induction in isopropyl β -D-1-galactopyranoside (IPTG). After GST-Nef protein solubilization from the bacterial lysate, a one step purification of GST-Nef protein was conducted by affinity chromatography on glutathione agarose (Sigma Chemical Co. – USA). Purification of glutathione S-transferase (GST) protein was expressed in DH5 α cell

transformed with pGEX-2T vector and solubilization of the protein was performed as described for GST-Nef.

2.2. Nanoglycolipidic particles (NP) and formulation of GST-Nef

The nanoglycolipidic particles were prepared from the maltodextrin as described previously (Major et al., 1997). These cationic particles were composed of polysaccharide (77%) and a mixture of DPPC and cholesterol (70:30, w/w). Formulation of GST-Nef was performed by simple mixing the protein and the nanoglycolipidic particles in a ratio of 1/40 (w/w).

2.3. Immunogens

GST-Nef was formulated with cationic nanoglycolipid particles of about 100 nm in diameter or were mixed with: (i) complete Freund's adjuvant (CFA), (ii) muramyl dipeptide (MDP), (iii) association of incomplete Freund's adjuvant (IFA) and MDP.

2.4. Immunization of mice

Female BALB/c mice (H-2d) were obtained from IFFA Credo (France) and kept in standard housing with rodent chow and water available *ad libitum*, on a 12 h light/dark cycle. Experiments were performed in compliance with French and European regulations on animal experimentation and were approved by the local animal experiments ethical committee. BALB/c mice were merged into four groups of five. Six to eight weeks old mice were used for subcutaneous immunizations. Five mice were immunized with 10 μ g of recombinant GST-Nef containing nanoglycolipidic particles (200 μ L) or with GST-Nef in association with Complete Freund's Adjuvant or Muramyl Dipeptide or with Complete Freund's adjuvant associated with Muramyl Dipeptide. Injections were repeated subcutaneously on each 3 weeks interval with the same antigen doses.

2.5. Samples

Animals were bled for serum at day 0, 14, 35, 58 and 98. More precisely sera were obtained from blood samples collected by retro-orbital punctures 2 weeks after each injection.

2.6. Enzyme linked immune sorbent assay: ELISA

Serological responses to measure anti-Nef antibodies titers were performed by an end-point enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Maxisorb microtiter wells (Nunc, Denmark) were coated either with 50 μ L of recombinant GST-Nef or with GST at 10 μ g/mL in phosphate buffered saline (PBS) pH7.4 for 2 h at 37 °C. Wells were blocked with 200 μ L of PBS supplemented with 5% milk for 1 h at 37 °C and then washed with PBS containing 0.2% Tween20. Wells were then incubated with 50 μ L of various sera dilutions. Sera were diluted in PBS with 0.5% milk and 0.05% Tween20 and were incubated for 2 h at 37 °C. After extensive washing, absorbed antibodies were detected with 50 μ L of horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Dako S.A., France). After one hour of incubation followed by washing, 100 μ L of O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma, France) dissolved in phosphate citrate buffer, pH5, activated with H₂O₂ were added as a substrate. Colour development was stopped after 20 minutes by adding 30 μ L of 4N H₂SO₄ and the 490/600 nm absorbance ratio was measured. Antibody titers were expressed as the reciprocal of the final dilution which gave an absorbance ratio of 0.2.

For the determination of the levels of GST-Nef specific IgG1 and IgG2a responses, peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG1

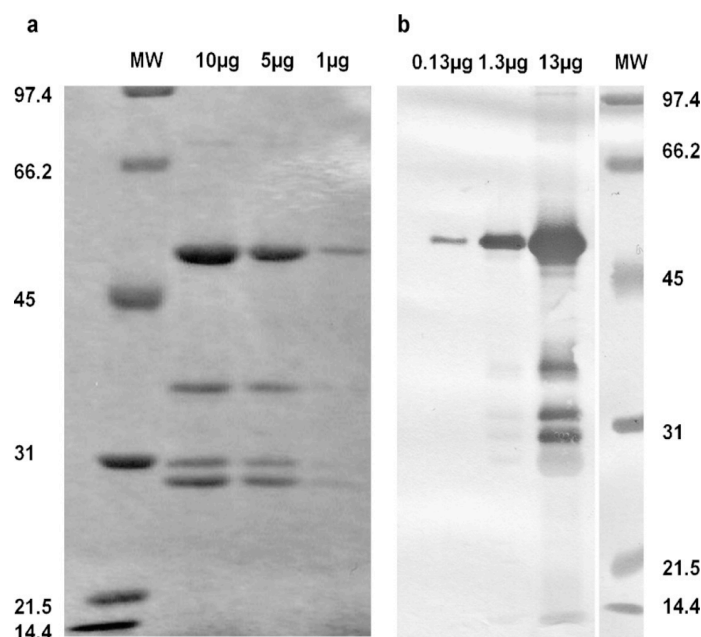


Fig. 1. Characterization of affinity purified GST-Nef_{SIVmac 251}. Produced and purified GST-Nef_{SIVmac 251} (1 µg, 5 µg and 10 µg) was analyzed by SDS-PAGE (a) and by WB using an anti-Nef antibodies (b).

or IgG2a (Santa Cruz, USA) were substituted for the anti-mouse immunoglobulins described above.

Antibody titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution which gave an absorbance ratio of 0.2.

2.7. Western blots

The equivalent of 1 to 10 µg of GST-Nef protein were heated at 100 °C for 3 min in the presence of 10% SDS and 1% β-mercaptoethanol before running sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After transfer, the nitrocellulose membrane was blocked with 5% dried milk for 2 h at room temperature. GST-Nef was characterized by incubating the nitrocellulose membrane with rabbit anti GST-Nef antibodies. After intensive washing, the membrane was incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit immunoglobulin (Dako S.A, France) for 1 h at room temperature. Staining was detected with PBS containing diaminobenzidine and 0.1% H₂O₂.

3. Results

3.1. Production and purification of GST-Nef_{SIVmac 251}

The recombinant protein was produced as a nonmyristoylated molecule in *E.coli* transformed with the GST-nef_{SIVmac 251} gene. GST-Nef protein was purified by affinity chromatography on glutathione agarose. Three major proteins remained bound to the solid phase and were eluted after adding reduced glutathione (Fig. 1). The first band, migrating at 55 kDa, corresponds to GST-Nef that at 38 kDa was a derivative of GST-Nef and the double band at 27 kDa corresponds to two GST isomers.

3.2. Characterization of formulated GST-Nef protein

The formulation of GST-Nef protein was evaluated by SDS-PAGE and Western blot. Results presented in Fig 2, clearly show the presence of GST-Nef (Fig. 2 lane 1). The fact to find a similar panel of GST-Nef formulated in particles as that obtained with the purified

protein (Fig. 1 lane 2) indicated that the procedure of formulation did not cause protein alterations such as oligomerization or degradation. It is also interesting to note that formulated GST-Nef remained stable at least during 3 months when stored at 4 °C (data not shown).

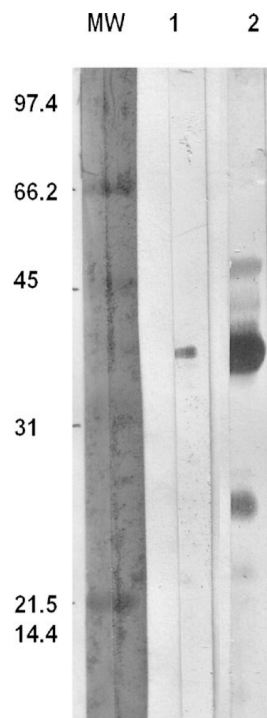


Fig. 2. Characterization of nanoglycolipidic particles associated with GST-Nef. Nanoglycolipidic particles associated with GST-Nef (1 µg) were analyzed by WB using an anti-GST antibody (1) or anti-Nef antibody (2).

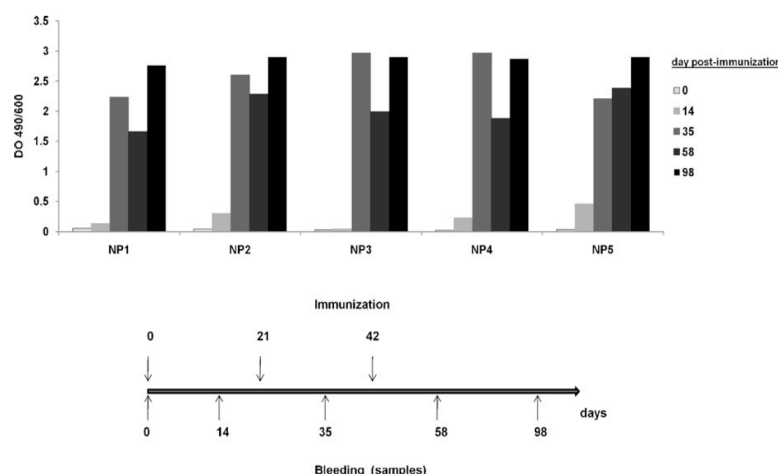


Fig. 3. Titration of anti-GST-Nef sera. Sera obtained at days 0, 14, 35, 58, 98 post-immunization from mice immunized with GST-Nef associated with nanoglycolipidic particles (NP1–NP5) were tested by ELISA against GST-Nef.

3.3. Adjuvant effects of the nanoglycolipidic particles

In order to test the adjuvant effect of the nanoglycolipidic particles the formulated GST-Nef was injected subcutaneously to a group of 5 BALB/c mice. The kinetics of anti-Nef antibodies production was evaluated by testing the presence of anti-GST-Nef antibodies in the sera obtained at days 14, 35, 58 and 89. As expected, no antibodies were detected in the sera obtained before immunization (pre immune sera). Anti GST-Nef antibodies became detectable in all five mice from the first immunization with GST-Nef associated NP. The titers increased over the course of GST-Nef injections (Fig. 3). The highest titers were reached after the second injection. These results clearly underline the great adjuvant effect of these nanoglycolipidic particles. It is also interesting to note the safety of these vectors. Indeed no clinical manifestations of toxicity or reactions at the injection site were observed in mice after administration of formulated GST-Nef.

One limitation of the use of vectors in the development of vaccines or in gene therapy is related to their capacity to stimulate a specific immune response against the vector. To explore this eventuality, sera obtained from mice after the third injection were tested by ELISA against the vector alone or formulated with GST-Nef. In this case, no significant positive reactions were observed against the vector alone in the five sera tested (Fig. 5). These results indicated that glycolipidic parts of the nanoglycolipidic particles are not immunogens. In parallel we tested the immune reactivity of antibodies produced against GST-Nef associated with nanoglycolipidic particles by ELISA against GST or GST-Nef. The sera of the five immunized mice were titrated by testing various dilutions. The obtained results showed preferential response against the Nef part of the fusion protein with a titer at least ten times higher than that obtained against GST (Fig. 4).

3.4. Comparison of the adjuvant effect of the glycolipidic nanoglycolipidic particles and Freund's adjuvant or muramyl dipeptide adjuvant

In order to compare the adjuvant effect of the glycolipidic nanoglycolipidic particles, with the more known adjuvant: CFA, IFA in association with MDP or MDP alone, we immunized three other groups of mice with the same amount of GST-Nef in association with the cited adjuvants. The kinetics and anti-GST-Nef titers were analyzed as described above. At a kinetic level, it is interesting to note that no significant positive reaction except in one mouse was

observed in the sera of these three groups of mice (Fig. 6), while a clear positive response was observed after the first injection in the 5 out of 5 sera from mice immunized with GST-Nef associated with the nanoglycolipidic particles (Fig. 3). These results indicated the efficient adjuvant effect of the nanoglycolipidic particles. However, after the second injection a strong response comparable to that obtained with the nanoglycolipidic particles was observed in the two groups of mice immunized with GST-Nef in association with CFA or IFA + MDP (data not shown). In contrast, only a weak response was obtained in mice immunized with GST-Nef in association with MDP alone (Fig. 6).

3.5. Analysis of anti-GST-Nef antibody isotypes

We analyzed the IgG1 and IgG2a isotypes of specific antibodies produced in mice immunized with SIV GST-Nef associated with NP, CFA, MDP or a mixture of MDP and IFA. Sera obtained after the last injection were tested by ELISA using recombinant GST-Nef protein to coat the wells and peroxidase-conjugated anti-IgG1 or IgG2a for the visualization. The results depicted in Fig. 7 showed the predominance of IgG1 antibody isotypes in all animal groups. These protocols of immunization lead to IgG1/IgG2a ratios of 8.8, 3.6, 4.5 and 10.5 in animals immunized with Nef associated with NP, CFA, MDP or a mixture of MDP and IFA respectively. These data suggest the predominance of a Th2 type immune response.

4. Discussion

The need to develop an efficient HIV-1 vaccine remains a high priority of this century. In fact, the majority of approaches aimed to induce neutralizing antibodies and/or cellular cytotoxic cells against HIV/SIV gave modest efficacy (Rerks-Ngarm et al., 2009; Tatsis et al., 2009; Buchbinder et al., 2008). However, it is interesting to note that a recent study using a fragment of gp41 HIV-1 grafted on virovesicles as immunogen and delivered by mucosal route to monkeys (*Macaca mulatta*) induced mucosal antibodies able to protect against vaginal SHIV challenges (Bomsel et al., 2011). This latter study underlines the importance of the design of novel immunogens and vectors.

In addition, the success of traditional vaccines based on killed viruses or bacteria is mainly due to the presence of ligands capable of stimulating innate immunity, which in turn contributes to the development of specific immunity. This intrinsic adjuvant effect is mainly related to the capacity of some components, such as viral

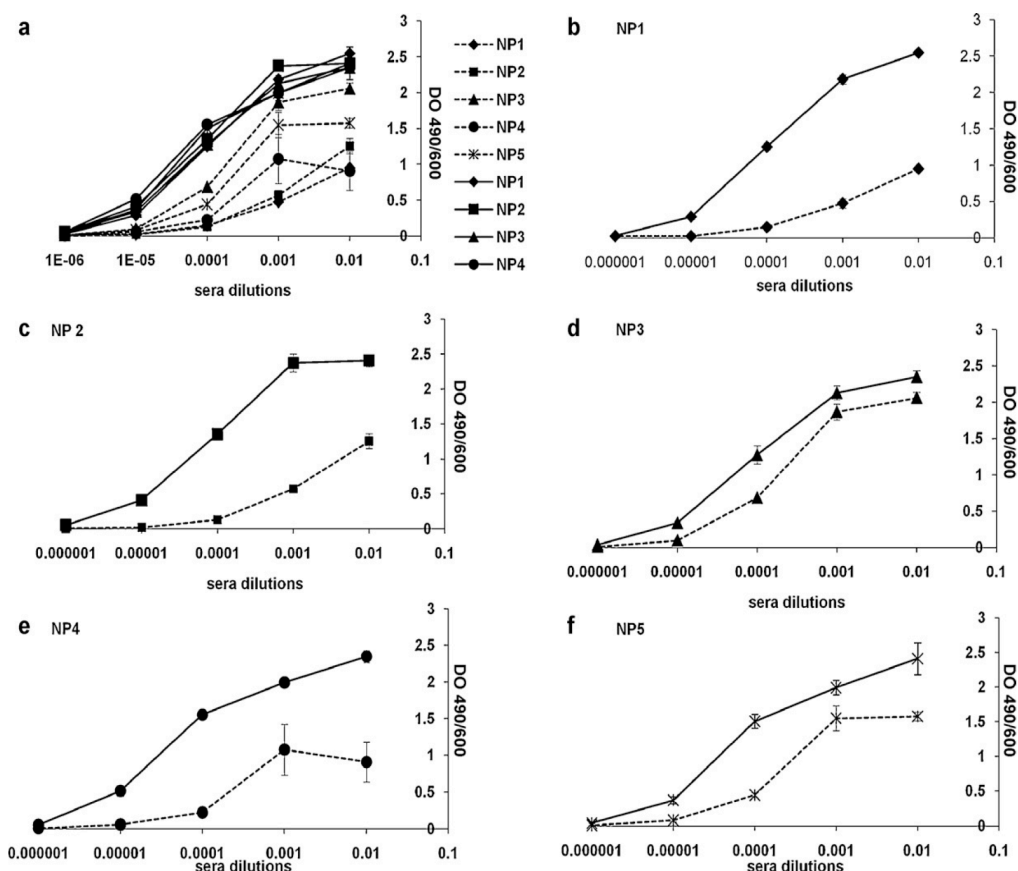


Fig. 4. Immunoreactivity of anti-GST-Nef antibodies against GST-Nef and GST. Sera from mice immunized with GST-Nef associated with nanoglycolipid particles (NP1–NP5) were tested by ELISA against GST-Nef (solid line) and against GST alone (dashed line). The results of all mice are presented in (a), the results for mouse NP1 in (b) mouse NP2 in (c) mouse NP3 in (d), mouse NP4 in (e) and mouse NP5 in (f).

single strand or double strand RNA to stimulate TLR7/8 and TLR3 respectively, or bacterial CpG, LPS and other glycolipidic molecules to stimulate a large panel of TLR pathways including TLR2, 4, 5 and 9 (Kawai and Akira, 2010; Takeuchi and Akira, 2010). However, thanks to the development of genetic engineering and the inability to culture some viruses *in vitro*, such as the Hepatitis B virus (Tiollais and Chen, 2010), vaccines based on soluble recombinant proteins were emerged. One great limitation of this approach is the weak or the absence of immunogenicity of the soluble proteins to stimulate the innate immunity (McElrath and Haynes, 2010), in addition to their poor stability *in vivo*. To circumvent these limitations, different strategies have been used for the formulation of solu-

ble proteins either by their encapsulation in lipidic or glycolipidic particles including liposomes (Heurtault et al., 2010), virosomes (Buonaguro et al., 2010), ISCOMs or by their association with adjuvant such as complete Freund's adjuvant, aluminum hydroxide and several other adjuvants based on mineral oil (Coffman et al., 2010).

In this study we showed that the adsorption of GST-Nef from SIVmac251 on the nanoglycolipidic particles enhances the immunogenicity of this soluble protein. This enhancement is manifested by the rapid detection of anti-Nef antibodies. One injection seems to be sufficient to generate detectable amount of anti-Nef antibodies. While at least two injections, except in one mouse from five in the group immunized with Nef in association with IFA/MDP,

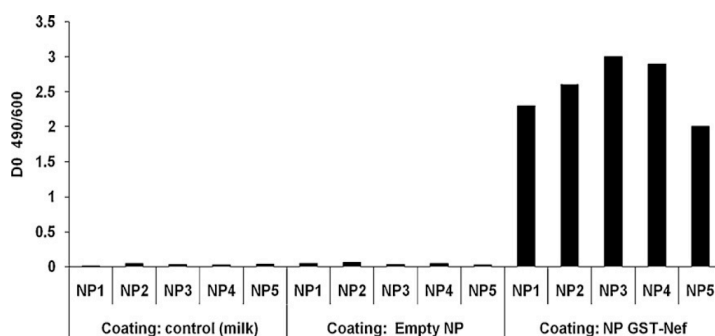


Fig. 5. Nanoparticles alone are not immunogens. Sera of the last injection of mice immunized with GST-Nef associated with nanoglycolipidic (NP1–NP5) were tested by ELISA against control (milk), empty nanoglycolipidic particles or GST-Nef associated with nanoglycolipidic particles.

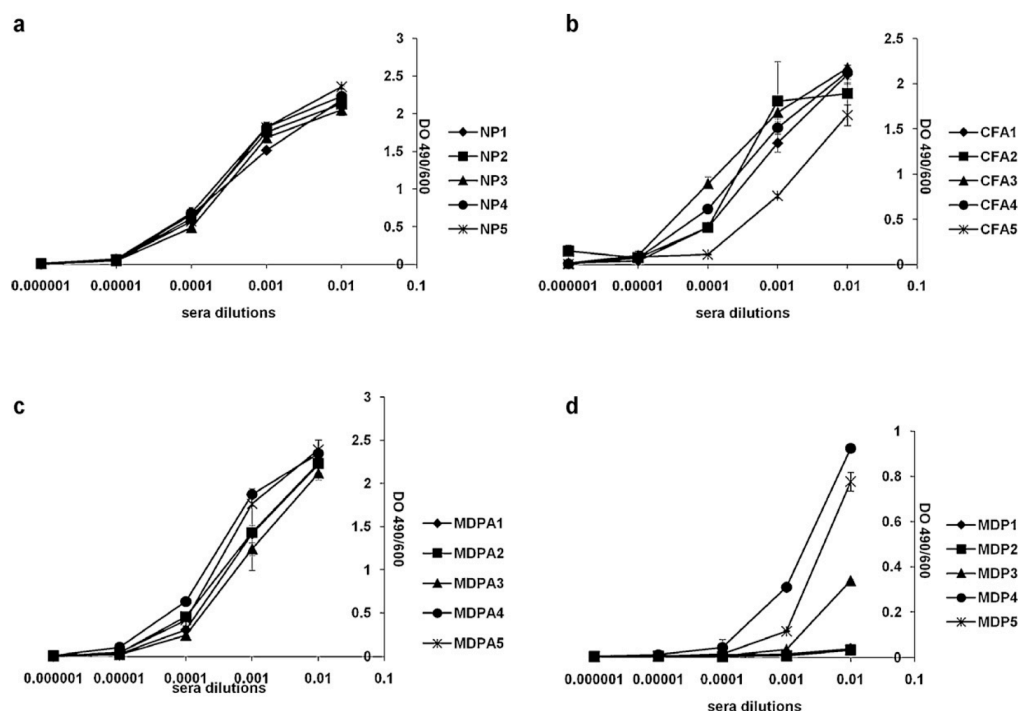


Fig. 6. Comparison of the adjuvant effect of the nanoparticles and CFA, MDP and IFA/MDP. Sera from mice immunized with GST-Nef associated with nanoglycolipidic particles (NP1–NP2) (a), GST-Nef formulated with CFA (CFA1–CFA5) (b), with a mixture of MDP and IFA (MDPA1–MDPA5) (c) and MDP (MDP1–MDP2) (d) were tested against GST-Nef by ELISA.

are needed in the groups receiving CFA, mixture of IFA and MDP or MDP as adjuvant. The protocols in this study using three injections at 3 weeks intervals were chosen because it leads to strong humoral responses with immunogens emulsified in CFA, one of the most powerful adjuvant. Due to its toxicity this adjuvant is not allowed in humans. The analysis of the kinetics of the anti-GST-Nef humoral response showed that the highest titer of anti-GST-Nef antibodies was reached since the second injection. While a third injection seems to be needed to reach this highest titer in the presence of CFA or the mixture of IFA and MDP. However when the muramyl dipeptide (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine), a synthetic peptidoglycan, was used as adjuvant only a moderate

humoral immune response was observed as shown by the weak titers reached after the third injection. This weak immunogenicity may be related to the rapid degradation of the GST-Nef when administered in soluble mixture with MDP. In contrast, in the three other protocols, the immunogens are associated with the nanoparticles or entrapped in the oil emulsion. As a consequence the immunogens are protected from rapid protease degradation and are probably released gradually over a large period of time. This latter explanation is consistent with the long lasting persistence of the anti-Nef titers. Indeed, three months after the last injection the anti-Nef antibody titers remained stable in the group of mice immunized in the presence of nanoglycolipidic particles and CFA or IFA in mixture with MDP.

When we compared the immunogenicity related to the GST part to that of the Nef, the obtained data showed the strongest response against the Nef part. This phenomenon is observed only in the group of mice immunized with GST-Nef associated with the nanoglycolipidic particles. This effect may be related to the mode of formulation and presentation of GST-Nef in the nanoglycolipidic particles. It is possible that the sequence of Nef, located at the C-terminal part of fusion protein, is more accessible at the surface the nanoglycolipidic particles, or is more processed and efficiently presented par MHC-class II antigens when released in the endosome/lysosome. It is also possible that the formulation of GST-Nef into the nanoglycolipidic particles is homogeneously oriented.

The primary benefit of this formulation is the presentation of the immunogen to APCs. Such targeting is facilitated in part by the size of the particles. Interestingly, the particle size is similar to that of retroviruses (100 nm) and allows its internalization by endocytosis (Berton et al., 1997; Chang et al., 2009; Dombu et al., 2010). This targeting is facilitating by the electrostatic interaction between the cationic charge of the nanoglycolipidic particles and the negative charges of the cell membrane. In addition to the protection of the antigen from rapid degradation, its formulation in

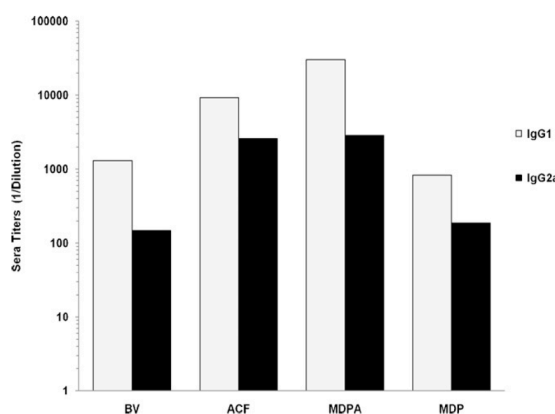


Fig. 7. Analysis of the anti-GST-Nef antibody isotypes. Sera from mice immunized with GST-Nef associated with nanoglycolipidic particles (NP), or mixed with CFA (CFA), or a MDP and IFA (MDPA) (c) or MDP alone (MDP) were tested against GST-Nef by ELISA. The IgG isotypes were measured by using peroxidase-conjugated anti-mouse IgG1 or IgG2a immunoglobulins.

these nanoglycolipidic particles allowed its release in the endosome where it associates with MHC class II antigens. It is important also to note that in contrast to the majority of adjuvants tested in animal models, only few adjuvants are allowed to be administered to humans. The nanoglycolipidic particles used in this assay are showed to be safe in mice and human, when administered in the noses of human volunteers (von Hoegen, 2001). In addition it was demonstrated that in contrast to the more used adjuvant of the mucosal immunity, including the detoxified LT and CT toxins, these types of nanoparticles are able to stimulate the mucosal immunity without the side effects due to the inflammation and the cytotoxicity (van Ginkel et al., 2000). Indeed when used as adjuvant, LT and CT detoxified toxins target the nervous system via the olfactory bulb when administered by intranasal route and stimulate the production of inflammatory cytokines including TNF- α and IL-1 β .

5. Conclusion

Taken together, these results demonstrated the effectiveness of the nanoglycolipidic particles to deliver GST-Nef protein to induce a strong and long lasting immune response. Indeed the nanoglycolipidic particles could overcome the limitations of other adjuvants and enhance the immunological activities and efficiency of vaccine proteins.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS), SIDACTION, and Ministère de la recherche et des Technologies. Ben Haij Nawal is recipient of a fellowship from MRT. We thank SA Biovector, and Dr D Betbeder for the preparation of the nanoparticles.

References

- Baba, T.W., Liska, V., Khimani, A.H., Ray, N.B., Dailey, P.J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M.F., McClure, H.M., Martin, L.N., Ruprecht, R.M., 1999. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat. Med.* 5, 194–203.
- Baur, A.S., Sawai, E.T., Dazin, P., Fantl, W.J., Cheng-Mayer, C., Peterlin, B.M., 1994. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* 1, 373–384.
- Benson, R.E., Sanfridson, A., Ottinger, J.S., Doyle, C., Cullen, B.R., 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J. Exp. Med.* 177, 1561–1566.
- Berton, M., Sixou, S., Kravtsoff, R., Dartigues, C., Imbertie, L., Allal, C., Favre, G., 1997. Improved oligonucleotide uptake and stability by a new drug carrier, the SupraMolecular Bio Vector (SMBV). *Biochim. Biophys. Acta* 1355, 7–19.
- Bomsel, M., Tudor, D., Drillet, A.S., Alfsen, A., Ganor, Y., Roger, M.G., Mouz, N., Amacker, M., Chalifour, A., Diomedea, L., Devillier, G., Cong, Z., Wei, Q., Gao, H., Qin, C., Yang, G.B., Zurbriggen, R., Lopalco, L., Fleury, S., 2011. Immunization with HIV-1 gp41 subunit viroosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* 34, 269–280.
- Buchbinder, S.P., Mehrotra, D.V., Duerr, A., Fitzgerald, D.W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P.B., Lama, J.R., Marmor, M., Del Rio, C., McElrath, M.J., Casimiro, D.R., Gottesdiener, K.M., Chodakewitz, J.A., Corey, L., Robertson, M.N., 2008. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372, 1881–1893.
- Buonaguro, L., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., 2010. Virus-like particles as particulate vaccines. *Curr. HIV Res.* 8, 299–309.
- Castignolles, N., Morgeaux, S., Gontier-Jallet, C., Samain, D., Betbeder, D., Perrin, P., 1996. A new family of carriers (biovectors) enhances the immunogenicity of rabies antigens. *Vaccine* 14, 1353–1360.
- Cazeau, N., Bannasser, Y., Vidal, P.L., Li, Z., Paulin, D., Bahraoui, E., 2002. Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. *Vaccine* 20, 3322–3331.
- Chakrabarti, L., Baptiste, V., Khatissian, E., Cumont, M.C., Aubertin, A.M., Montagnier, L., Hurtrel, B., 1995. Limited viral spread and rapid immune response in lymph nodes of macaques inoculated with attenuated simian immunodeficiency virus. *Virology* 213, 535–548.
- Chang, J., Jallouli, Y., Kroubi, M., Yuan, X.B., Feng, W., Kang, C.S., Pu, P.Y., Betbeder, D., 2009. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood–brain barrier. *Int. J. Pharm.* 379, 285–292.
- Chowers, M.Y., Spina, C.A., Kwok, T.J., Fitch, N.J., Richman, D.D., Guatelli, J.C., 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* 68, 2906–2914.
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492–503.
- Collette, Y., Mawas, C., Olive, D., 1996. Evidence for intact CD28 signaling in T cell hyporesponsiveness induced by the HIV-1 nef gene. *Eur. J. Immunol.* 26, 1788–1793.
- Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D., Baltimore, D., 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391, 397–401.
- Daniel, M.D., Kirchhoff, F., Czajak, S.C., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258, 1938–1941.
- De Miguel, L., Imbertie, L., Rieumajou, V., Major, M., Kravtsoff, R., Betbeder, D., 2000. Proofs of the structure of lipid coated nanoparticles (SMBV) used as drug carriers. *Pharm. Res.* 17, 817–824.
- De, S.K., Marsh, J.W., 1994. HIV-1 Nef inhibits a common activation pathway in NIH-3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 6656–6660.
- Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V.A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Learmont, J., Sullivan, J.S., Cunningham, A., Dwyer, D., Downton, D., Mills, J., 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270, 988–991.
- Debin, A., Kravtsoff, R., Santiago, J.V., Cazales, L., Sperandio, S., Melber, K., Janowicz, Z., Betbeder, D., Moynier, M., 2002. Intranasal immunization with recombinant antigens associated with new cationic particles induces strong mucosal as well as systemic antibody and CTL responses. *Vaccine* 20, 2752–2763.
- Dombu, C.Y., Kroubi, M., Zibouche, R., Matran, R., Betbeder, D., 2010. Characterization of endocytosis and exocytosis of cationic nanoparticles in airway epithelium cells. *Nanotechnology* 21, 355102.
- Fackler, O.T., Alcover, A., Schwartz, O., 2007. Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nat. Rev. Immunol.* 7, 310–317.
- Foster, J.L., Garcia, J.V., 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5, 84.
- Franchini, G., Robert-Guroff, M., Ghayeb, J., Chang, N.T., Wong-Staal, F., 1986. Cytoplasmic localization of the HTLV-III 3' orf protein in cultured T cells. *Virology* 155, 593–599.
- Garcia, J.V., Miller, A.D., 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350, 508–511.
- Greene, J.M., Lhost, J.J., Burwitz, B.J., Budde, M.L., Macnair, C.E., Weiker, M.K., Gostick, E., Friedrich, T.C., Broman, K.W., Price, D.A., O'Connor, S.L., O'Connor, D.H., 2010. Extralymphoid CD8+ T cells resident in tissue from simian immunodeficiency virus SIVmac239(Delta)nef-vaccinated macaques suppress SIVmac239 replication ex vivo. *J. Virol.* 84, 3362–3372.
- Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L., Lecoq, J.P., 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* 330, 266–269.
- Heurtault, B., Frisch, B., Pons, F., 2010. Liposomes as delivery systems for nasal vaccination: strategies and outcomes. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 7, 829–844.
- Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., Nomaguchi, M., 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication in vitro. *Microbes Infect.* 12, 65–70.
- Kaminchik, J., Margalit, R., Yaish, S., Drummer, H., Amit, B., Sarver, N., Gorecki, M., Panet, A., 1994. Cellular distribution of HIV type 1 Nef protein: identification of domains in Nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1003–1010.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.
- Kestler 3rd, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65, 651–662.
- Major, M., Prieur, E., Tocanne, J.F., Betbeder, D., Sautereau, A.M., 1997. Characterization and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta* 1327, 32–40.
- Mariani, R., Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Sullivan, J.L., Desrosiers, R.C., Skowronski, J., 1996. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 70, 7752–7764.
- McElrath, M.J., De Rosa, S.C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O.D., Carter, D.K., Hural, J., Akondy, R., Buchbinder, S.P., Robertson, M.N., Mehrotra, D.V., Self, S.G., Corey, L., Shiver, J.W., Casimiro, D.R., 2008. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 372, 1894–1905.
- McElrath, M.J., Haynes, B.F., 2010. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity* 33, 542–554.
- Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Gaston, L., Greene, W.C., Feinberg, M.B., 1994. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 179, 101–113.
- Moureaux, C., Vidal, P.L., Bannasser, Y., Moynier, M., Nicaise, Y., Aussillous, M., Barthelemy, S., Montagnier, L., Bahraoui, E., 2002. Characterization of humoral and cellular immune responses in mice induced by immunization with HIV-1 Nef regulatory protein encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *Mol. Immunol.* 38, 607–618.
- Noviello, C.M., Benichou, S., Guatelli, J.C., 2008. Cooperative binding of the class I major histocompatibility complex cytoplasmic domain and human immunod-

- efficiency virus type 1 Nef to the endosomal AP-1 complex via its mu subunit. *J. Virol.* 82, 1249–1258.
- Otake, K., Fujii, Y., Nakaya, T., Nishino, Y., Zhong, Q., Fujinaga, K., Kameoka, M., Ohki, K., Ikuta, K., 1994. The carboxyl-terminal region of HIV-1 Nef protein is a cell surface domain that can interact with CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 153, 5826–5837.
- Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., van Griensven, F., Hu, D., Tappero, J.W., Choopanya, K., 2006. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J. Infect. Dis.* 194, 1661–1671.
- Prieur, E., Betbeder, D., Niedergang, F., Major, M., Alcover, A., Davignon, J.L., Davrinche, C., 1996. Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80 nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4⁺ T-cell clones in vitro. *Vaccine* 14, 511–520.
- Raymond, A.D., Campbell-Sims, T.C., Khan, M., Lang, M., Huang, M.B., Bond, V.C., Powell, M.D., 2011. HIV Type 1 Nef is released from infected cells in CD45(+) microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27, 167–178.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premrui, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., Benenson, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., McNeil, J.G., Francis, D.P., Stablein, D., Birx, D.L., Chunsuttiwat, S., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Robb, M.L., Michael, N.L., Kunasol, P., Kim, J.H., 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361, 2209–2220.
- Rudolph, J.M., Eickel, N., Haller, C., Schindler, M., Fackler, O.T., 2009. Inhibition of T-cell receptor-induced actin remodeling and relocalization of Lck are evolutionarily conserved activities of lentiviral Nef proteins. *J. Virol.* 83, 11528–11539.
- Sinclair, E., Barbosa, P., Feinberg, M.B., 1997. The nef gene products of both simian and human immunodeficiency viruses enhance virus infectivity and are functionally interchangeable. *J. Virol.* 71, 3641–3651.
- Stolp, B., Reichman-Fried, M., Abraham, L., Pan, X., Giese, S.I., Hannemann, S., Goulimari, P., Raz, E., Grosse, R., Fackler, O.T., 2009. HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin. *Cell Host Microbe* 6, 174–186.
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tatsis, N., Lasaro, M.O., Lin, S.W., Haut, L.H., Xiang, Z.Q., Zhou, D., Dimenna, L., Li, H., Bian, A., Abdulla, S., Li, Y., Giles-Davis, W., Engram, J., Ratcliffe, S.J., Silvestri, G., Ertl, H.C., Betts, M.R., 2009. Adenovirus vector-induced immune responses in nonhuman primates: responses to prime boost regimens. *J. Immunol.* 182, 6587–6599.
- Tiollais, P., Chen, Z., 2010. The hepatitis B. *Pathol. Biol. (Paris)* 58, 243–244.
- van Ginkel, F.W., Jackson, R.J., Yuki, Y., McGhee, J.R., 2000. Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J. Immunol.* 165, 4778–4782.
- von Hoegen, P., 2001. Synthetic biomimetic supra molecular biovector (SMBV) particles for nasal vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51, 113–125.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H., and Johnson, P. R. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2, *Nature* 339, 389-392.
2. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science* 220, 868-871.
3. Schnittman, S. M., Lane, H. C., Roth, J., Burrows, A., Folks, T. M., Kehrl, J. H., Koenig, S., Berman, P., and Fauci, A. S. (1988) Characterization of GP120 binding to CD4 and an assay that measures ability of sera to inhibit this binding, *J Immunol* 141, 4181-4186.
4. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dautuet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., and et al. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS, *Science* 233, 343-346.
5. McCutchan, F. E. (2000) Understanding the genetic diversity of HIV-1, *AIDS 14 Suppl 3*, S31-44.
6. Peeters, M., and Sharp, P. M. (2000) Genetic diversity of HIV-1: the moving target, *AIDS 14 Suppl 3*, S129-140.
7. Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Arya, S., Gallo, R. C., and Haseltine, W. A. (1985) Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat, *Science* 227, 171-173.
8. Emerman, M., and Malim, M. H. (1998) HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology, *Science* 280, 1880-1884.
9. Hoglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K., and Gabuzda, D. (1994) Role of vif during packing of the core of HIV-1, *Virology* 201, 349-355.
10. Kozak, S. L., Platt, E. J., Madani, N., Ferro, F. E., Jr., Peden, K., and Kabat, D. (1997) CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1, *Journal of virology* 71, 873-882.
11. Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R. (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain, *Cell* 47, 333-348.
12. Platt, E. J., Wehrly, K., Kuhmann, S. E., Chesebro, B., and Kabat, D. (1998) Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1, *Journal of virology* 72, 2855-2864.
13. Stebbing, J., Gazzard, B., and Douek, D. C. (2004) Where does HIV live?, *N Engl J Med* 350, 1872-1880.
14. Pollakis, G., and Paxton, W. A. (2012) Use of (alternative) coreceptors for HIV entry, *Current opinion in HIV and AIDS* 7, 440-449.
15. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., and Paxton, W. A. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5, *Nature* 381, 667-673.
16. Grivel, J. C., and Margolis, L. B. (1999) CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue, *Nature medicine* 5, 344-346.
17. Shankarappa, R., Margolick, J. B., Gange, S. J., Rodrigo, A. G., Upchurch, D., Farzadegan, H., Gupta, P., Rinaldo, C. R., Learn, G. H., He, X., Huang, X. L., and Mullins, J. I. (1999) Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection, *Journal of virology* 73, 10489-10502.
18. Engelman, A., and Cherepanov, P. (2012) The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights, *Nature reviews. Microbiology* 10, 279-290.
19. Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature* 312, 763-767.
20. Bernstein, H. B., Tucker, S. P., Kar, S. R., McPherson, S. A., McPherson, D. T., Dubay, J. W., Lebowitz, J., Compans, R. W., and Hunter, E. (1995) Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41, *J Virol* 69, 2745-2750.
21. Chambers, P., Pringle, C. R., and Easton, A. J. (1990) Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins, *The Journal of general virology* 71 (Pt 12), 3075-3080.
22. de la Vega, M., Marin, M., Kondo, N., Miyauchi, K., Kim, Y., Epand, R. F., Epand, R. M., and Melikyan, G. B. (2011) Inhibition of HIV-1 endocytosis allows lipid mixing at the plasma membrane, but not complete fusion, *Retrovirology* 8, 99.

23. Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V., and Melikyan, G. B. (2009) HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes, *Cell* 137, 433-444.
24. Miyauchi, K., Kozlov, M. M., and Melikyan, G. B. (2009) Early steps of HIV-1 fusion define the sensitivity to inhibitory peptides that block 6-helix bundle formation, *PLoS pathogens* 5, e1000585.
25. Melikyan, G. B. (2008) Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm, *Retrovirology* 5, 111.
26. Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein, *Cell* 89, 263-273.
27. Kozak, S. L., Heard, J. M., and Kabat, D. (2002) Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus, *Journal of virology* 76, 1802-1815.
28. Chazal, N., and Gerlier, D. (2003) Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 67, 226-237, table of contents.
29. Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M., and Saag, M. S. (1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry, *Nature medicine* 4, 1302-1307.
30. Kromdijk, W., Huitema, A. D., and Mulder, J. W. (2010) Treatment of HIV infection with the CCR5 antagonist maraviroc, *Expert opinion on pharmacotherapy* 11, 1215-1223.
31. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S., and Landau, N. R. (1997) Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals, *The Journal of experimental medicine* 185, 621-628.
32. Scarlatti, G., Tresoldi, E., Bjorndal, A., Fredriksson, R., Colognesi, C., Deng, H. K., Malnati, M. S., Plebani, A., Siccardi, A. G., Littman, D. R., Fenyo, E. M., and Lusso, P. (1997) In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression, *Nature medicine* 3, 1259-1265.
33. Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., and O'Brien, S. J. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study, *Science* 273, 1856-1862.
34. Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N. R., Phair, J., Ho, D. D., and Koup, R. A. (1996) The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression, *Nat Med* 2, 1240-1243.
35. Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection, *Cell* 86, 367-377.
36. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene, *Nature* 382, 722-725.
37. Fenouillet, E., Clerget-Raslain, B., Gluckman, J. C., Guetard, D., Montagnier, L., and Bahraoui, E. (1989) Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis, *The Journal of experimental medicine* 169, 807-822.
38. Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells, *Cell* 100, 587-597.
39. Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses, *Cell* 100, 575-585.
40. Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prevost, M. C., Allen, T. D., and Charneau, P. (2007) HIV-1 DNA Flap formation promotes

- uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore, *The EMBO journal* 26, 3025-3037.
41. Bowerman, B., Brown, P. O., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1989) A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA, *Genes & development* 3, 469-478.
 42. Ao, Z., Yao, X., and Cohen, E. A. (2004) Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system, *Journal of virology* 78, 3170-3177.
 43. Hameau, L., Jeusset, J., Lafosse, S., Coulaud, D., Delain, E., Unge, T., Restle, T., Le Cam, E., and Mirambeau, G. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 central DNA flap: dynamic terminal product of plus-strand displacement dna synthesis catalyzed by reverse transcriptase assisted by nucleocapsid protein, *Journal of virology* 75, 3301-3313.
 44. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap, *Cell* 101, 173-185.
 45. Mansky, L. M., and Temin, H. M. (1995) Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase, *Journal of virology* 69, 5087-5094.
 46. Franke, E. K., and Luban, J. (1995) Cyclophilin and gag in HIV-1 replication and pathogenesis, *Advances in experimental medicine and biology* 374, 217-228.
 47. Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex, *The Journal of biological chemistry* 273, 13347-13352.
 48. Berkhout, B., Silverman, R. H., and Jeang, K. T. (1989) Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target, *Cell* 59, 273-282.
 49. Daar, E. S., Moudgil, T., Meyer, R. D., and Ho, D. D. (1991) Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection, *The New England journal of medicine* 324, 961-964.
 50. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P., and Fauci, A. S. (1993) HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease, *Nature* 362, 355-358.
 51. Tindall, B., and Cooper, D. A. (1991) Primary HIV infection: host responses and intervention strategies, *AIDS* 5, 1-14.
 52. Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P., and Levy, J. A. (1986) CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication, *Science* 234, 1563-1566.
 53. Meier, A., Alter, G., Frahm, N., Sidhu, H., Li, B., Bagchi, A., Teigen, N., Streeck, H., Stellbrink, H. J., Hellman, J., van Lunzen, J., and Altfeld, M. (2007) MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands, *Journal of virology* 81, 8180-8191.
 54. Alter, G., Suscovich, T. J., Teigen, N., Meier, A., Streeck, H., Brander, C., and Altfeld, M. (2007) Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells, *J Immunol* 178, 7658-7666.
 55. Schlaepfer, E., and Speck, R. F. (2008) Anti-HIV activity mediated by natural killer and CD8+ cells after toll-like receptor 7/8 triggering, *PloS one* 3, e1999.
 56. Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D., and Bhardwaj, N. (2005) Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions, *The Journal of clinical investigation* 115, 3265-3275.
 57. Meier, A., and Altfeld, M. (2007) Toll-like receptor signaling in HIV-1 infection: a potential target for therapy?, *Expert review of anti-infective therapy* 5, 323-326.
 58. Breckpot, K., Escors, D., Arce, F., Lopes, L., Karwacz, K., Van Lint, S., Keyaerts, M., and Collins, M. (2010) HIV-1 lentiviral vector immunogenicity is mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7, *Journal of virology* 84, 5627-5636.
 59. Gougeon, M. L. (2003) Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack, *Nature reviews. Immunology* 3, 392-404.
 60. Badley, A. D., Pilon, A. A., Landay, A., and Lynch, D. H. (2000) Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis, *Blood* 96, 2951-2964.
 61. Prendergast, A., Prado, J. G., Kang, Y. H., Chen, F., Riddell, L. A., Luzzi, G., Goulder, P., and Klenerman, P. (2010) HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells, *AIDS* 24, 491-502.
 62. Hunt, P. W. (2010) Th17, gut, and HIV: therapeutic implications, *Current opinion in HIV and AIDS* 5, 189-193.

63. Epple, H. J., Schneider, T., Troeger, H., Kunkel, D., Allers, K., Moos, V., Amasheh, M., Loddenkemper, C., Fromm, M., Zeitz, M., and Schulzke, J. D. (2009) Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients, *Gut* 58, 220-227.
64. Epple, H. J., and Zeitz, M. (2012) HIV infection and the intestinal mucosal barrier, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1258, 19-24.
65. Schmitz, H., Rokos, K., Florian, P., Gitter, A. H., Fromm, M., Scholz, P., Ullrich, R., Zeitz, M., Pauli, G., and Schulzke, J. D. (2002) Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells, *AIDS* 16, 983-991.
66. Buccigrossi, V., Laudiero, G., Nicastro, E., Miele, E., Esposito, F., and Guarino, A. (2011) The HIV-1 transactivator factor (Tat) induces enterocyte apoptosis through a redox-mediated mechanism, *PLoS one* 6, e29436.
67. Canani, R. B., De Marco, G., Passariello, A., Buccigrossi, V., Ruotolo, S., Bracale, I., Porcaro, F., Bifulco, G., and Guarino, A. (2006) Inhibitory effect of HIV-1 Tat protein on the sodium-D-glucose symporter of human intestinal epithelial cells, *AIDS* 20, 5-10.
68. Clayton, F., Kapetanovic, S., and Kotler, D. P. (2001) Enteric microtubule depolymerization in HIV infection: a possible cause of HIV-associated enteropathy, *AIDS* 15, 123-124.
69. Brenchley, J. M., Price, D. A., and Douek, D. C. (2006) HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?, *Nature immunology* 7, 235-239.
70. Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B. R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J. N., Hecht, F. M., Picker, L. J., Lederman, M. M., Deeks, S. G., and Douek, D. C. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection, *Nature medicine* 12, 1365-1371.
71. Mandl, J. N., Barry, A. P., Vanderford, T. H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F. J., Coffman, R. L., Staprans, S. I., and Feinberg, M. B. (2008) Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections, *Nature medicine* 14, 1077-1087.
72. Mir, K. D., Bosinger, S. E., Gasper, M., Ho, O., Else, J. G., Brenchley, J. M., Kelvin, D. J., Silvestri, G., Hu, S. L., and Sodora, D. L. (2012) Simian immunodeficiency virus-induced alterations in monocyte production of tumor necrosis factor alpha contribute to reduced immune activation in sooty mangabeys, *Journal of virology* 86, 7605-7615.
73. Mahajan, S. D., Agosto-Mojica, A., Aalinkeel, R., Reynolds, J. L., Nair, B. B., Sykes, D. E., Martinez, J., Adams, J., Singh, N., Bernstein, Z., Hsiao, C. B., and Schwartz, S. A. (2010) Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease, *Biochemical and biophysical research communications* 396, 348-352.
74. Stylianou, E., Aukrust, P., Kvale, D., Muller, F., and Froland, S. S. (1999) IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy, *Clinical and experimental immunology* 116, 115-120.
75. Clerici, M., and Shearer, G. M. (1993) A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection, *Immunology today* 14, 107-111.
76. Huber, M., von Wyl, V., Ammann, C. G., Kuster, H., Stiegler, G., Katinger, H., Weber, R., Fischer, M., Stoiber, H., Gunthard, H. F., and Trkola, A. (2008) Potent human immunodeficiency virus-neutralizing and complement lysis activities of antibodies are not obligatorily linked, *Journal of virology* 82, 3834-3842.
77. Stoiber, H., Banki, Z., Wilflingseder, D., and Dierich, M. P. (2008) Complement-HIV interactions during all steps of viral pathogenesis, *Vaccine* 26, 3046-3054.
78. Frank, I., Stoiber, H., Godar, S., Stockinger, H., Steindl, F., Katinger, H. W., and Dierich, M. P. (1996) Acquisition of host cell-surface-derived molecules by HIV-1, *AIDS* 10, 1611-1620.
79. Banki, Z., Posch, W., Ejaz, A., Oberhauser, V., Willey, S., Gassner, C., Stoiber, H., Dittmer, U., Dierich, M. P., Hasenkrug, K. J., and Wilflingseder, D. (2010) Complement as an endogenous adjuvant for dendritic cell-mediated induction of retrovirus-specific CTLs, *PLoS pathogens* 6, e1000891.
80. Kopf, M., Abel, B., Gallimore, A., Carroll, M., and Bachmann, M. F. (2002) Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection, *Nature medicine* 8, 373-378.
81. Kacani, L., Prodinger, W. M., Sprinzl, G. M., Schwendinger, M. G., Spruth, M., Stoiber, H., Dopfer, S., Steinhuber, S., Steindl, F., and Dierich, M. P. (2000) Detachment of human immunodeficiency virus type 1 from germinal centers by blocking complement receptor type 2, *Journal of virology* 74, 7997-8002.

82. Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1995) Apoptosis in HIV infection, *Nature medicine* 1, 118-120.
83. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., and Haynes, B. F. (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development, *Nature reviews. Immunology* 10, 11-23.
84. Stacey, A. R., Norris, P. J., Qin, L., Haygreen, E. A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., Self, S. G., and Borrow, P. (2009) Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections, *Journal of virology* 83, 3719-3733.
85. Katze, M. G., He, Y., and Gale, M., Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy, *Nature reviews. Immunology* 2, 675-687.
86. Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., and Lanzavecchia, A. (1999) Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA, *The Journal of experimental medicine* 189, 821-829.
87. Yang, K., Puel, A., Zhang, S., Eidenschenk, C., Ku, C. L., Casrouge, A., Picard, C., von Bernuth, H., Senechal, B., Plancoulaine, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaium, A., Marodi, L., Davidson, D., Speert, D., Roifman, C., Garty, B. Z., Ozinsky, A., Barrat, F. J., Coffman, R. L., Miller, R. L., Li, X., Lebon, P., Rodriguez-Gallego, C., Chapel, H., Geissmann, F., Jouanguy, E., and Casanova, J. L. (2005) Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses, *Immunity* 23, 465-478.
88. Guiducci, C., Ott, G., Chan, J. H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K. D., Coffman, R. L., and Barrat, F. J. (2006) Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation, *The Journal of experimental medicine* 203, 1999-2008.
89. Casartelli, N., Guivel-Benhassine, F., Bouziat, R., Brandler, S., Schwartz, O., and Moris, A. (2010) The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells, *The Journal of experimental medicine* 207, 39-49.
90. Peng, G., Lei, K. J., Jin, W., Greenwell-Wild, T., and Wahl, S. M. (2006) Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity, *The Journal of experimental medicine* 203, 41-46.
91. Biswas, P., Poli, G., Kinter, A. L., Justement, J. S., Stanley, S. K., Maury, W. J., Bressler, P., Orenstein, J. M., and Fauci, A. S. (1992) Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells, *The Journal of experimental medicine* 176, 739-750.
92. Saha, R. N., and Pahan, K. (2003) Tumor necrosis factor-alpha at the crossroads of neuronal life and death during HIV-associated dementia, *Journal of neurochemistry* 86, 1057-1071.
93. Herbein, G., Montaner, L. J., and Gordon, S. (1996) Tumor necrosis factor alpha inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: a selective role for the 75-kilodalton receptor, *Journal of virology* 70, 7388-7397.
94. Naif, H., Ho-Shon, M., Chang, J., and Cunningham, A. L. (1994) Molecular mechanisms of IL-4 effect on HIV expression in promonocytic cell lines and primary human monocytes, *Journal of leukocyte biology* 56, 335-339.
95. Griffin, G. E., Leung, K., Folks, T. M., Kunkel, S., and Nabel, G. J. (1991) Induction of NF-kappa B during monocyte differentiation is associated with activation of HIV-gene expression, *Research in virology* 142, 233-238.
96. Herbein, G., and Gordon, S. (1997) 55- and 75-kilodalton tumor necrosis factor receptors mediate distinct actions in regard to human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages, *Journal of virology* 71, 4150-4156.
97. Han, X., Becker, K., Degen, H. J., Jablonowski, H., and Strohmeyer, G. (1996) Synergistic stimulatory effects of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma on replication of human immunodeficiency virus type 1 and on apoptosis of HIV-1-infected host cells, *European journal of clinical investigation* 26, 286-292.
98. Herbein, G., Van Lint, C., Lovett, J. L., and Verdin, E. (1998) Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes, *Journal of virology* 72, 660-670.

99. Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (1997) Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells, *The Journal of experimental medicine* 185, 461-469.
100. Poli, G., and Fauci, A. S. (1992) The role of monocyte/macrophages and cytokines in the pathogenesis of HIV infection, *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 60, 246-251.
101. Kedzierska, K., and Crowe, S. M. (2001) Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications, *Antiviral chemistry & chemotherapy* 12, 133-150.
102. Montaner, J. S., and Schechter, M. T. (1994) Time for realism over HIV infection, *Lancet* 344, 535-536.
103. Wang, Q., and Huang, J. (1998) [Expression of eNOS and IL-10 gene in signal transduction for liver regeneration], *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]* 36, 522-524.
104. Weissman, D., Poli, G., and Fauci, A. S. (1994) Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus, *AIDS research and human retroviruses* 10, 1199-1206.
105. Ancuta, P., Bakri, Y., Chomont, N., Hocini, H., Gabuzda, D., and Haeffner-Cavaillon, N. (2001) Opposite effects of IL-10 on the ability of dendritic cells and macrophages to replicate primary CXCR4-dependent HIV-1 strains, *J Immunol* 166, 4244-4253.
106. Sozzani, S., Ghezzi, S., Iannolo, G., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Sica, A., Locati, M., Mackay, C., Wells, T. N., Biswas, P., Vicenzi, E., Poli, G., and Mantovani, A. (1998) Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes, *The Journal of experimental medicine* 187, 439-444.
107. Clerici, M., Stocks, N. I., Zajac, R. A., Boswell, R. N., Bernstein, D. C., Mann, D. L., Shearer, G. M., and Berzofsky, J. A. (1989) Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals, *Nature* 339, 383-385.
108. Clerici, M., Villa, M. L., and Shearer, G. M. (1994) The role of cytokines in immune response to HIV, *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* 41 Suppl, 5-10.
109. Kumar, A., Angel, J. B., Daftarian, M. P., Parato, K., Cameron, W. D., Fillion, L., and Diaz-Mitoma, F. (1998) Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals: association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness, *Clinical and experimental immunology* 114, 78-86.
110. Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B. J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S. G., Van Grevenynghe, J., Boulassel, M. R., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Routy, J. P., Douek, D. C., Haddad, E. K., and Sekaly, R. P. (2010) Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection, *Nature medicine* 16, 452-459.
111. Shankar, E. M., Che, K. F., Messmer, D., Lifson, J. D., and Larsson, M. (2011) Expression of a broad array of negative costimulatory molecules and Blimp-1 in T cells following priming by HIV-1 pulsed dendritic cells, *Mol Med* 17, 229-240.
112. Muller, A., Schmitt, L., Raftery, M., and Schonrich, G. (1998) Paralysis of B7 co-stimulation through the effect of viral IL-10 on T cells as a mechanism of local tolerance induction, *European journal of immunology* 28, 3488-3498.
113. Muller, F., Aukrust, P., Nordoy, I., and Froland, S. S. (1998) Possible role of interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human immunodeficiency virus infection: modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion, *Blood* 92, 3721-3729.
114. Ostrowski, M. A., Gu, J. X., Kovacs, C., Freedman, J., Luscher, M. A., and MacDonald, K. S. (2001) Quantitative and qualitative assessment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4⁺ T cell immunity to gag in HIV-1-infected individuals with differential disease progression: reciprocal interferon-gamma and interleukin-10 responses, *The Journal of infectious diseases* 184, 1268-1278.
115. Barcova, M., Kacani, L., Speth, C., and Dierich, M. P. (1998) gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production, *The Journal of infectious diseases* 177, 905-913.
116. Borghi, P., Fantuzzi, L., Varano, B., Gessani, S., Puddu, P., Conti, L., Capobianchi, M. R., Ameglio, F., and Belardelli, F. (1995) Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes/macrophages, *Journal of virology* 69, 1284-1287.

117. Schols, D., and De Clercq, E. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production, *Journal of virology* 70, 4953-4960.
118. Badou, A., Bennasser, Y., Moreau, M., Leclerc, C., Benkirane, M., and Bahraoui, E. (2000) Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway, *Journal of virology* 74, 10551-10562.
119. Brigino, E., Haraguchi, S., Koutsonikolis, A., Cianciolo, G. J., Owens, U., Good, R. A., and Day, N. K. (1997) Interleukin 10 is induced by recombinant HIV-1 Nef protein involving the calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase signal transduction pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3178-3182.
120. Creery, D., Angel, J. B., Aucoin, S., Weiss, W., Cameron, W. D., Diaz-Mitoma, F., and Kumar, A. (2002) Nef protein of human immunodeficiency virus and lipopolysaccharide induce expression of CD14 on human monocytes through differential utilization of interleukin-10, *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9, 1212-1221.
121. Sabado, R. L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K. V., Siegal, F., Shodell, M., Shah, K., Larsson, M., Lifson, J., Nadas, A., Marmor, M., Hutt, R., Margolis, D., Garmon, D., Markowitz, M., Valentine, F., Borrow, P., and Bhardwaj, N. (2010) Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection, *Blood* 116, 3839-3852.
122. Carter, C. A., and Ehrlich, L. S. (2008) Cell biology of HIV-1 infection of macrophages, *Annual review of microbiology* 62, 425-443.
123. Crowe, S., Zhu, T., and Muller, W. A. (2003) The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection, *Journal of leukocyte biology* 74, 635-641.
124. Montaner, L. J., Crowe, S. M., Aquaro, S., Perno, C. F., Stevenson, M., and Collman, R. G. (2006) Advances in macrophage and dendritic cell biology in HIV-1 infection stress key understudied areas in infection, pathogenesis, and analysis of viral reservoirs, *Journal of leukocyte biology* 80, 961-964.
125. Eugenin, E. A., and Berman, J. W. (2003) Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier, *Methods* 29, 351-361.
126. Persidsky, Y., Zheng, J., Miller, D., and Gendelman, H. E. (2000) Mononuclear phagocytes mediate blood-brain barrier compromise and neuronal injury during HIV-1-associated dementia, *Journal of leukocyte biology* 68, 413-422.
127. Kedzierska, K., and Crowe, S. M. (2002) The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection, *Current medicinal chemistry* 9, 1893-1903.
128. Fantuzzi, L., Belardelli, F., and Gessani, S. (2003) Monocyte/macrophage-derived CC chemokines and their modulation by HIV-1 and cytokines: a complex network of interactions influencing viral replication and AIDS pathogenesis, *Journal of leukocyte biology* 74, 719-725.
129. Gartner, S., and Liu, Y. (2002) Insights into the role of immune activation in HIV neuropathogenesis, *Journal of neurovirology* 8, 69-75.
130. Pu, H., Tian, J., Flora, G., Lee, Y. W., Nath, A., Hennig, B., and Toborek, M. (2003) HIV-1 Tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain, *Molecular and cellular neurosciences* 24, 224-237.
131. Kramer, B., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M., Garcia, E., Piguet, V., and Marsh, M. (2005) HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells, *Blood cells, molecules & diseases* 35, 136-142.
132. Mazzolini, J., Herit, F., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., and Niedergang, F. (2010) Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments, *Blood* 115, 4226-4236.
133. Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K., and Benarous, R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif, *Molecular cell* 1, 565-574.
134. Federico, M., Percario, Z., Olivetta, E., Fiorucci, G., Muratori, C., Micheli, A., Romeo, G., and Affabris, E. (2001) HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors, *Blood* 98, 2752-2761.
135. Coberley, C. R., Kohler, J. J., Brown, J. N., Oshier, J. T., Baker, H. V., Popp, M. P., Sleasman, J. W., and Goodenow, M. M. (2004) Impact on genetic networks in human

- macrophages by a CCR5 strain of human immunodeficiency virus type 1, *Journal of virology* 78, 11477-11486.
136. Olivetta, E., Pietraforte, D., Schiavoni, I., Minetti, M., Federico, M., and Sanchez, M. (2005) HIV-1 Nef regulates the release of superoxide anions from human macrophages, *The Biochemical journal* 390, 591-602.
 137. Cicala, C., Arthos, J., Selig, S. M., Dennis, G., Jr., Hosack, D. A., Van Ryk, D., Spangler, M. L., Steenbeke, T. D., Khazanie, P., Gupta, N., Yang, J., Daucher, M., Lempicki, R. A., and Fauci, A. S. (2002) HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9380-9385.
 138. Izmailova, E., Bertley, F. M., Huang, Q., Makori, N., Miller, C. J., Young, R. A., and Aldovini, A. (2003) HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages, *Nature medicine* 9, 191-197.
 139. Woelk, C. H., Ottones, F., Plotkin, C. R., Du, P., Royer, C. D., Rought, S. E., Lozach, J., Sasik, R., Kornbluth, R. S., Richman, D. D., and Corbeil, J. (2004) Interferon gene expression following HIV type 1 infection of monocyte-derived macrophages, *AIDS research and human retroviruses* 20, 1210-1222.
 140. Andrews, D. M., Scalzo, A. A., Yokoyama, W. M., Smyth, M. J., and Degli-Esposti, M. A. (2003) Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection, *Nature immunology* 4, 175-181.
 141. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Fuchs, A., Colonna, M., and Caligiuri, M. A. (2004) NK cell and DC interactions, *Trends in immunology* 25, 47-52.
 142. Ferlazzo, G., and Munz, C. (2004) NK cell compartments and their activation by dendritic cells, *J Immunol* 172, 1333-1339.
 143. Mavilio, D., Lombardo, G., Kinter, A., Fogli, M., La Sala, A., Ortolano, S., Farschi, A., Follmann, D., Gregg, R., Kovacs, C., Marcenaro, E., Pende, D., Moretta, A., and Fauci, A. S. (2006) Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection, *The Journal of experimental medicine* 203, 2339-2350.
 144. Zitvogel, L. (2002) Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity, *The Journal of experimental medicine* 195, F9-14.
 145. Kottlil, S. (2003) Natural killer cells in HIV-1 infection: role of NK cell-mediated non-cytolytic mechanisms in pathogenesis of HIV-1 infection, *Indian journal of experimental biology* 41, 1219-1225.
 146. Mavilio, D., Benjamin, J., Daucher, M., Lombardo, G., Kottlil, S., Planta, M. A., Marcenaro, E., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., and Fauci, A. S. (2003) Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15011-15016.
 147. Scott-Algara, D., Vuillier, F., Cayota, A., and Dighiero, G. (1992) Natural killer (NK) cell activity during HIV infection: a decrease in NK activity is observed at the clonal level and is not restored after in vitro long-term culture of NK cells, *Clinical and experimental immunology* 90, 181-187.
 148. Portales, P., Reynes, J., Pinet, V., Rouzier-Panis, R., Baillat, V., Clot, J., and Corbeau, P. (2003) Interferon-alpha restores HIV-induced alteration of natural killer cell perforin expression in vivo, *AIDS* 17, 495-504.
 149. Alter, G., Teigen, N., Davis, B. T., Addo, M. M., Suscovich, T. J., Waring, M. T., Streeck, H., Johnston, M. N., Staller, K. D., Zaman, M. T., Yu, X. G., Lichterfeld, M., Basgoz, N., Rosenberg, E. S., and Altfeld, M. (2005) Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection, *Blood* 106, 3366-3369.
 150. Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M. A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., and Fauci, A. S. (2005) Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2886-2891.
 151. Maccario, R., Comoli, P., Percivalle, E., Montagna, D., Locatelli, F., and Gerna, G. (1995) Herpes simplex virus-specific human cytotoxic T-cell colonies expressing either gamma delta or alpha beta T-cell receptor: role of accessory molecules on HLA-unrestricted killing of virus-infected targets, *Immunology* 85, 49-56.
 152. Cipriani, B., Borsellino, G., Poccia, F., Placido, R., Tramonti, D., Bach, S., Battistini, L., and Brosnan, C. F. (2000) Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood

- gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines, *Blood* 95, 39-47.
153. Poccia, F., Malkovsky, M., Pollak, A., Colizzi, V., Sireci, G., Salerno, A., and Dieli, F. (1999) In vivo gammadelta T cell priming to mycobacterial antigens by primary Mycobacterium tuberculosis infection and exposure to nonpeptidic ligands, *Mol Med* 5, 471-476.
 154. Imami, N., Pires, A., Hardy, G., Wilson, J., Gazzard, B., and Gotch, F. (2002) A balanced type 1/type 2 response is associated with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection, *Journal of virology* 76, 9011-9023.
 155. Clerici, M., Wynn, T. A., Berzofsky, J. A., Blatt, S. P., Hendrix, C. W., Sher, A., Coffman, R. L., and Shearer, G. M. (1994) Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus, *J Clin Invest* 93, 768-775.
 156. Norris, P. J., Pappalardo, B. L., Custer, B., Spotts, G., Hecht, F. M., and Busch, M. P. (2006) Elevations in IL-10, TNF-alpha, and IFN-gamma from the earliest point of HIV Type 1 infection, *AIDS research and human retroviruses* 22, 757-762.
 157. Boucher, J. G., Parato, K. A., Frappier, F., Fairman, P., Busca, A., Saxena, M., Blahoiianu, M. A., Ma, W., Gajanayaka, N., Parks, R. J., Kumar, A., and Angel, J. B. (2010) Disparate regulation of LPS-induced MAPK signaling and IL-12p40 expression between different myeloid cell types with and without HIV infection, *Viral immunology* 23, 17-28.
 158. Buisson, S., Benlahrech, A., Gazzard, B., Gotch, F., Kelleher, P., and Patterson, S. (2009) Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10, *The Journal of infectious diseases* 199, 1862-1871.
 159. Daftarian, M. P., Diaz-Mitoma, F., Creery, W. D., Cameron, W., and Kumar, A. (1995) Dysregulated production of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by peripheral blood lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals is associated with altered proliferative responses to recall antigens, *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2, 712-718.
 160. Marshall, J. D., Chehimi, J., Gri, G., Kostman, J. R., Montaner, L. J., and Trinchieri, G. (1999) The interleukin-12-mediated pathway of immune events is dysfunctional in human immunodeficiency virus-infected individuals, *Blood* 94, 1003-1011.
 161. Jones, M. L., Young, J. M., Huang, Q. R., Puls, R. L., Webber, C. A., and Benson, E. M. (2003) Interleukin 12-augmented T cell proliferation of peripheral blood mononuclear cells from HIV-seropositive individuals is associated with interleukin 12 receptor beta 2 upregulation, *AIDS research and human retroviruses* 19, 283-292.
 162. Landay, A. L., Clerici, M., Hashemi, F., Kessler, H., Berzofsky, J. A., and Shearer, G. M. (1996) In vitro restoration of T cell immune function in human immunodeficiency virus-positive persons: effects of interleukin (IL)-12 and anti-IL-10, *The Journal of infectious diseases* 173, 1085-1091.
 163. Chong, S. Y., Egan, M. A., Kutzler, M. A., Megati, S., Masood, A., Roopchand, V., Garcia-Hand, D., Montefiori, D. C., Quiroz, J., Rosati, M., Schadeck, E. B., Boyer, J. D., Pavlakis, G. N., Weiner, D. B., Sidhu, M., Eldridge, J. H., and Israel, Z. R. (2007) Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques, *Vaccine* 25, 4967-4982.
 164. Hirao, L. A., Wu, L., Khan, A. S., Satishchandran, A., Draghia-Akli, R., and Weiner, D. B. (2008) Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques, *Vaccine* 26, 440-448.
 165. Gupta, S., Boppana, R., Mishra, G. C., Saha, B., and Mitra, D. (2008) Interleukin-12 is necessary for the priming of CD4+ T cells required during the elicitation of HIV-1 gp120-specific cytotoxic T-lymphocyte function, *Immunology* 124, 553-561.
 166. Gupta, S., Boppana, R., Mishra, G. C., Saha, B., and Mitra, D. (2008) HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner, *J Immunol* 180, 79-88.
 167. Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R., and Kastelein, R. A. (2004) WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27, *J Immunol* 172, 2225-2231.
 168. Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R.,

- Rennick, D., and Kastelein, R. A. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells, *Immunity* 16, 779-790.
169. Guzzo, C., Che Mat, N. F., and Gee, K. (2010) Interleukin-27 induces a STAT1/3- and NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokine profile in human monocytes, *The Journal of biological chemistry* 285, 24404-24411.
170. Kalliolias, G. D., and Ivashkiv, L. B. (2008) IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38, *J Immunol* 180, 6325-6333.
171. Fakruddin, J. M., Lempicki, R. A., Gorelick, R. J., Yang, J., Adelsberger, J. W., Garcia-Pineros, A. J., Pinto, L. A., Lane, H. C., and Imamichi, T. (2007) Noninfectious papilloma virus-like particles inhibit HIV-1 replication: implications for immune control of HIV-1 infection by IL-27, *Blood* 109, 1841-1849.
172. Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T., and Douek, D. C. (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract, *The Journal of experimental medicine* 200, 749-759.
173. Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., and Markowitz, M. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract, *The Journal of experimental medicine* 200, 761-770.
174. Raffatellu, M., Santos, R. L., Verhoeven, D. E., George, M. D., Wilson, R. P., Winter, S. E., Godinez, I., Sankaran, S., Paixao, T. A., Gordon, M. A., Kolls, J. K., Dandekar, S., and Baumler, A. J. (2008) Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut, *Nature medicine* 14, 421-428.
175. Gori, A., Tincati, C., Rizzardini, G., Torti, C., Quirino, T., Haarman, M., Ben Amor, K., van Schaik, J., Vriesema, A., Knol, J., Marchetti, G., Welling, G., and Clerici, M. (2008) Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis, *Journal of clinical microbiology* 46, 757-758.
176. d'Ettorre, G., Paiardini, M., Ceccarelli, G., Silvestri, G., and Vullo, V. (2011) HIV-associated immune activation: from bench to bedside, *AIDS research and human retroviruses* 27, 355-364.
177. d'Ettorre, G., Paiardini, M., Zaffiri, L., Andreotti, M., Ceccarelli, G., Rizza, C., Indinnimeo, M., Vella, S., Mastroianni, C. M., Silvestri, G., and Vullo, V. (2011) HIV persistence in the gut mucosa of HIV-infected subjects undergoing antiretroviral therapy correlates with immune activation and increased levels of LPS, *Current HIV research* 9, 148-153.
178. Jiang, W., Lederman, M. M., Hunt, P., Sieg, S. F., Haley, K., Rodriguez, B., Landay, A., Martin, J., Sinclair, E., Asher, A. I., Deeks, S. G., Douek, D. C., and Brenchley, J. M. (2009) Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection, *The Journal of infectious diseases* 199, 1177-1185.
179. Ndhlovu, L. C., Chapman, J. M., Jha, A. R., Snyder-Cappione, J. E., Pagan, M., Leal, F. E., Boland, B. S., Norris, P. J., Rosenberg, M. G., and Nixon, D. F. (2008) Suppression of HIV-1 plasma viral load below detection preserves IL-17 producing T cells in HIV-1 infection, *AIDS* 22, 990-992.
180. Macal, M., Sankaran, S., Chun, T. W., Reay, E., Flamm, J., Prindiville, T. J., and Dandekar, S. (2008) Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses, *Mucosal immunology* 1, 475-488.
181. Cecchinato, V., Trindade, C. J., Laurence, A., Heraud, J. M., Brenchley, J. M., Ferrari, M. G., Zaffiri, L., Tryniskowska, E., Tsai, W. P., Vaccari, M., Parks, R. W., Venzon, D., Douek, D. C., O'Shea, J. J., and Franchini, G. (2008) Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques, *Mucosal immunology* 1, 279-288.
182. El Hed, A., Khaitan, A., Kozhaya, L., Manel, N., Daskalakis, D., Borkowsky, W., Valentine, F., Littman, D. R., and Unutmaz, D. (2010) Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection, *The Journal of infectious diseases* 201, 843-854.
183. Kinter, A. L., Horak, R., Sion, M., Riggan, L., McNally, J., Lin, Y., Jackson, R., O'Shea, A., Roby, G., Kovacs, C., Connors, M., Migueles, S. A., and Fauci, A. S. (2007) CD25+

- regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8⁺ T cells in vitro, *AIDS research and human retroviruses* 23, 438-450.
184. Moreno-Fernandez, M. E., Rueda, C. M., Rusie, L. K., and Chougnet, C. A. (2011) Regulatory T cells control HIV replication in activated T cells through a cAMP-dependent mechanism, *Blood* 117, 5372-5380.
 185. Moreno-Fernandez, M. E., Zapata, W., Blackard, J. T., Franchini, G., and Chougnet, C. A. (2009) Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain, *Journal of virology* 83, 12925-12933.
 186. Boasso, A., Vaccari, M., Nilsson, J., Shearer, G. M., Andersson, J., Cecchinato, V., Chougnet, C., and Franchini, G. (2006) Do regulatory T-cells play a role in AIDS pathogenesis?, *AIDS reviews* 8, 141-147.
 187. Ji, J., and Cloyd, M. W. (2009) HIV-1 binding to CD4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression, *International immunology* 21, 283-294.
 188. Schulze Zur Wiesch, J., Thomssen, A., Hartjen, P., Toth, I., Lehmann, C., Meyer-Olson, D., Colberg, K., Frerk, S., Babikir, D., Schmiedel, S., Degen, O., Mauss, S., Rockstroh, J., Staszewski, S., Khaykin, P., Strasak, A., Lohse, A. W., Fatkenheuer, G., Hauber, J., and van Lunzen, J. (2011) Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3⁺ T regulatory cells correlates with progressive disease, *Journal of virology* 85, 1287-1297.
 189. Weiss, L., Piketty, C., Assoumou, L., Didier, C., Caccavelli, L., Donkova-Petrini, V., Levy, Y., Girard, P. M., Burgard, M., Viard, J. P., Rouzioux, C., and Costagliola, D. (2010) Relationship between regulatory T cells and immune activation in human immunodeficiency virus-infected patients interrupting antiretroviral therapy, *PloS one* 5, e11659.
 190. Douek, D. C. (2003) Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease, *AIDS reviews* 5, 172-177.
 191. Kassiotis, G., and O'Garra, A. (2008) Immunology. Immunity benefits from a little suppression, *Science* 320, 1168-1169.
 192. Lawn, S. D., Butera, S. T., and Folks, T. M. (2001) Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection, *Clinical microbiology reviews* 14, 753-777, table of contents.
 193. Terzieva, V. (2008) Regulatory T cells and HIV-1 infection, *Viral immunology* 21, 285-291.
 194. Belkaid, Y., and Rouse, B. T. (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease, *Nature immunology* 6, 353-360.
 195. Fazekas de St Groth, B., and Landay, A. L. (2008) Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response?, *AIDS* 22, 671-683.
 196. Kinter, A., McNally, J., Riggan, L., Jackson, R., Roby, G., and Fauci, A. S. (2007) Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25⁺ regulatory T cells from HIV-infected individuals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3390-3395.
 197. Kanwar, B., Favre, D., and McCune, J. M. (2010) Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis, *Current opinion in HIV and AIDS* 5, 151-157.
 198. Alessandrini, L., Santarcangelo, A. C., Olivetta, E., Ferrantelli, F., d'Aloja, P., Pugliese, K., Pelosi, E., Chelucci, C., Mattia, G., Peschle, C., Verani, P., and Federico, M. (2000) T-tropic human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef protein enters human monocyte-macrophages and induces resistance to HIV replication: a possible mechanism of HIV T-tropic emergence in AIDS, *The Journal of general virology* 81, 2905-2917.
 199. Das, S. R., and Jameel, S. (2005) Biology of the HIV Nef protein, *The Indian journal of medical research* 121, 315-332.
 200. Ewart, G. D., Sutherland, T., Gage, P. W., and Cox, G. B. (1996) The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels, *Journal of virology* 70, 7108-7115.
 201. Mackay, G. A., Niu, Y., Liu, Z. Q., Mukherjee, S., Li, Z., Adany, I., Buch, S., Zhuge, W., McClure, H. M., Narayan, O., and Smith, M. S. (2002) Presence of Intact vpu and nef genes in nonpathogenic SHIV is essential for acquisition of pathogenicity of this virus by serial passage in macaques, *Virology* 295, 133-146.

202. Brandariz-Nunez, A., Valle-Casuso, J. C., White, T. E., Laguette, N., Benkirane, M., Brojatsch, J., and Diaz-Griffero, F. (2012) Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac, *Retrovirology* 9, 49.
203. Laguette, N., and Benkirane, M. (2012) How SAMHD1 changes our view of viral restriction, *Trends in immunology* 33, 26-33.
204. Laguette, N., Rahm, N., Sobhian, B., Chable-Bessia, C., Munch, J., Snoeck, J., Sauter, D., Switzer, W. M., Heneine, W., Kirchhoff, F., Delsuc, F., Telenti, A., and Benkirane, M. (2012) Evolutionary and functional analyses of the interaction between the myeloid restriction factor SAMHD1 and the lentiviral Vpx protein, *Cell host & microbe* 11, 205-217.
205. Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E. C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S., Canard, B., Laguette, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N. R., Kim, B., and Margottin-Goguet, F. (2012) SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates, *Nature immunology* 13, 223-228.
206. Kishi, M., Nishino, Y., Sumiya, M., Ohki, K., Kimura, T., Goto, T., Nakai, M., Kakinuma, M., and Ikuta, K. (1992) Cells surviving infection by human immunodeficiency virus type 1: vif or vpu mutants produce non-infectious or markedly less cytopathic viruses, *The Journal of general virology* 73 (Pt 1), 77-87.
207. Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N. R. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif, *Cell* 114, 21-31.
208. Conticello, S. G., Harris, R. S., and Neuberger, M. S. (2003) The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G, *Current biology : CB* 13, 2009-2013.
209. Strebel, K. (2007) HIV accessory genes Vif and Vpu, *Adv Pharmacol* 55, 199-232.
210. Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Yamamoto, T., Zhang, X., Miyamoto, Y., Muneta, K., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y. (2007) Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages, *Journal of virology* 81, 5284-5293.
211. DeHart, J. L., Zimmerman, E. S., Ardon, O., Monteiro-Filho, C. M., Arganaraz, E. R., and Planelles, V. (2007) HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system, *Virology journal* 4, 57.
212. Cui, J., Tungaturthi, P. K., Ayyavoo, V., Ghafouri, M., Ariga, H., Khalili, K., Srinivasan, A., Amini, S., and Sawaya, B. E. (2006) The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression, *Cell Cycle* 5, 2626-2638.
213. Bayer, P., Kraft, M., Ejchart, A., Westendorp, M., Frank, R., and Rosch, P. (1995) Structural studies of HIV-1 Tat protein, *J Mol Biol* 247, 529-535.
214. Foucault, M., Mayol, K., Receveur-Brechot, V., Bussat, M. C., Klinguer-Hamour, C., Verrier, B., Beck, A., Haser, R., Gouet, P., and Guillon, C. (2010) UV and X-ray structural studies of a 101-residue long Tat protein from a HIV-1 primary isolate and of its mutated, detoxified, vaccine candidate, *Proteins* 78, 1441-1456.
215. Watkins, J. D., Campbell, G. R., Halimi, H., and Loret, E. P. (2008) Homonuclear 1H NMR and circular dichroism study of the HIV-1 Tat Eli variant, *Retrovirology* 5, 83.
216. Zagury, J. F., Sill, A., Blattner, W., Lachgar, A., Le Buanec, H., Richardson, M., Rappaport, J., Hendel, H., Bizzini, B., Gringeri, A., Carcagno, M., Criscuolo, M., Burny, A., Gallo, R. C., and Zagury, D. (1998) Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine, *Journal of human virology* 1, 282-292.
217. Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P., and Beaumelle, B. (2004) HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses, *Molecular biology of the cell* 15, 2347-2360.
218. Rayne, F., Debaisieux, S., Bonhoure, A., and Beaumelle, B. (2010) HIV-1 Tat is unconventionally secreted through the plasma membrane, *Cell biology international* 34, 409-413.
219. Rayne, F., Debaisieux, S., Yezid, H., Lin, Y. L., Mettling, C., Konate, K., Chazal, N., Arold, S. T., Pugniere, M., Sanchez, F., Bonhoure, A., Briant, L., Loret, E., Roy, C., and Beaumelle, B. (2010) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells, *The EMBO journal* 29, 1348-1362.

220. Yezid, H., Konate, K., Debaisieux, S., Bonhoure, A., and Beaumelle, B. (2009) Mechanism for HIV-1 Tat insertion into the endosome membrane, *The Journal of biological chemistry* 284, 22736-22746.
221. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *The Journal of biological chemistry* 276, 5836-5840.
222. Yang, X., Gold, M. O., Tang, D. N., Lewis, D. E., Aguilar-Cordova, E., Rice, A. P., and Herrmann, C. H. (1997) TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12331-12336.
223. Ammosova, T., Berro, R., Kashanchi, F., and Nekhai, S. (2005) RNA interference directed to CDK2 inhibits HIV-1 transcription, *Virology* 341, 171-178.
224. Ammosova, T., Jerebtsova, M., Beullens, M., Lesage, B., Jackson, A., Kashanchi, F., Southerland, W., Gordeuk, V. R., Bollen, M., and Nekhai, S. (2005) Nuclear targeting of protein phosphatase-1 by HIV-1 Tat protein, *The Journal of biological chemistry* 280, 36364-36371.
225. Ammosova, T., Washington, K., Debebe, Z., Brady, J., and Nekhai, S. (2005) Dephosphorylation of CDK9 by protein phosphatase 2A and protein phosphatase-1 in Tat-activated HIV-1 transcription, *Retrovirology* 2, 47.
226. Deng, L., Ammosova, T., Pumfery, A., Kashanchi, F., and Nekhai, S. (2002) HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) and a dynamic association with CDK2 induce CTD phosphorylation and transcription from HIV-1 promoter, *The Journal of biological chemistry* 277, 33922-33929.
227. Cai, R., Carpick, B., Chun, R. F., Jeang, K. T., and Williams, B. R. (2000) HIV-I TAT inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms, *Archives of biochemistry and biophysics* 373, 361-367.
228. Endo-Munoz, L., Warby, T., Harrich, D., and McMillan, N. A. (2005) Phosphorylation of HIV Tat by PKR increases interaction with TAR RNA and enhances transcription, *Virology journal* 2, 17.
229. Hottiger, M. O., and Nabel, G. J. (1998) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein, *Journal of virology* 72, 8252-8256.
230. Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. (1996) Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator, *Virology* 216, 357-366.
231. Peterlin, B. M., and Price, D. H. (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb, *Molecular cell* 23, 297-305.
232. Peterlin, B. M., and Trono, D. (2003) Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication, *Nature reviews. Immunology* 3, 97-107.
233. Jeang, K. T., Xiao, H., and Rich, E. A. (1999) Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat, *The Journal of biological chemistry* 274, 28837-28840.
234. Gringhuis, S. I., van der Vlist, M., van den Berg, L. M., den Dunnen, J., Litjens, M., and Geijtenbeek, T. B. (2010) HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells, *Nature immunology* 11, 419-426.
235. Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R. A., Wingfield, P., and Gallo, R. C. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation, *Journal of virology* 67, 277-287.
236. Ott, M., Emiliani, S., Van Lint, C., Herbein, G., Lovett, J., Chirmule, N., McCloskey, T., Pahwa, S., and Verdin, E. (1997) Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway, *Science* 275, 1481-1485.
237. Albini, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M. G., Proudfoot, A. E., Alouani, S., Wells, T. N., Mariani, G., Rabin, R. L., Farber, J. M., and Noonan, D. M. (1998) HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13153-13158.
238. Mitola, S., Soldi, R., Zanon, I., Barra, L., Gutierrez, M. I., Berkhout, B., Giacca, M., and Bussolino, F. (2000) Identification of specific molecular structures of human

- immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells, *Journal of virology* 74, 344-353.
239. Mitola, S., Sozzani, S., Luini, W., Primo, L., Borsatti, A., Weich, H., and Bussolino, F. (1997) Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1, *Blood* 90, 1365-1372.
 240. Dhawan, S., Puri, R. K., Kumar, A., Duplan, H., Masson, J. M., and Aggarwal, B. B. (1997) Human immunodeficiency virus-1-tat protein induces the cell surface expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells, *Blood* 90, 1535-1544.
 241. Benelli, R., Mortarini, R., Anichini, A., Giunciuglio, D., Noonan, D. M., Montalti, S., Tacchetti, C., and Albini, A. (1998) Monocyte-derived dendritic cells and monocytes migrate to HIV-Tat RGD and basic peptides, *AIDS* 12, 261-268.
 242. Giacca, M. (2004) The HIV-1 Tat protein: a multifaceted target for novel therapeutic opportunities, *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* 4, 277-285.
 243. Albini, A., Benelli, R., Giunciuglio, D., Cai, T., Mariani, G., Ferrini, S., and Noonan, D. M. (1998) Identification of a novel domain of HIV tat involved in monocyte chemotaxis, *The Journal of biological chemistry* 273, 15895-15900.
 244. Albini, A., Soldi, R., Giunciuglio, D., Giraudo, E., Benelli, R., Primo, L., Noonan, D., Salio, M., Camussi, G., Rockl, W., and Bussolino, F. (1996) The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells, *Nature medicine* 2, 1371-1375.
 245. Mayol, K., Munier, S., Beck, A., Verrier, B., and Guillon, C. (2007) Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity, *Vaccine* 25, 6047-6060.
 246. Stettner, M. R., Nance, J. A., Wright, C. A., Kinoshita, Y., Kim, W. K., Morgello, S., Rappaport, J., Khalili, K., Gordon, J., and Johnson, E. M. (2009) SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, *The Journal of general virology* 90, 2005-2014.
 247. Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V., and Pardee, A. B. (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein, *Science* 268, 429-431.
 248. Li, C. J., Wang, C., Friedman, D. J., and Pardee, A. B. (1995) Reciprocal modulations between p53 and Tat of human immunodeficiency virus type 1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5461-5464.
 249. Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120, *Nature* 375, 497-500.
 250. Zauli, G., Gibellini, D., Caputo, A., Bassini, A., Negrini, M., Monne, M., Mazzoni, M., and Capitani, S. (1995) The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells, *Blood* 86, 3823-3834.
 251. Ensoli, B., Gendelman, R., Markham, P., Fiorelli, V., Colombini, S., Raffeld, M., Cafaro, A., Chang, H. K., Brady, J. N., and Gallo, R. C. (1994) Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma, *Nature* 371, 674-680.
 252. Del Valle, L., Croul, S., Morgello, S., Amini, S., Rappaport, J., and Khalili, K. (2000) Detection of HIV-1 Tat and JCV capsid protein, VP1, in AIDS brain with progressive multifocal leukoencephalopathy, *Journal of neurovirology* 6, 221-228.
 253. Wiley, C. A., Baldwin, M., and Achim, C. L. (1996) Expression of HIV regulatory and structural mRNA in the central nervous system, *AIDS* 10, 843-847.
 254. Hudson, L., Liu, J., Nath, A., Jones, M., Raghavan, R., Narayan, O., Male, D., and Everall, I. (2000) Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues, *Journal of neurovirology* 6, 145-155.
 255. Kim, B. O., Liu, Y., Ruan, Y., Xu, Z. C., Schantz, L., and He, J. J. (2003) Neuropathologies in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat protein under the regulation of the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein promoter and doxycycline, *The American journal of pathology* 162, 1693-1707.
 256. Kim, T. A., Avraham, H. K., Koh, Y. H., Jiang, S., Park, I. W., and Avraham, S. (2003) HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells, *J Immunol* 170, 2629-2637.

257. Nath, A., Haughey, N. J., Jones, M., Anderson, C., Bell, J. E., and Geiger, J. D. (2000) Synergistic neurotoxicity by human immunodeficiency virus proteins Tat and gp120: protection by memantine, *Annals of neurology* 47, 186-194.
258. Cheng, J., Nath, A., Knudsen, B., Hochman, S., Geiger, J. D., Ma, M., and Magnuson, D. S. (1998) Neuronal excitatory properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein, *Neuroscience* 82, 97-106.
259. Nath, A., Psooy, K., Martin, C., Knudsen, B., Magnuson, D. S., Haughey, N., and Geiger, J. D. (1996) Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic, *Journal of virology* 70, 1475-1480.
260. Pocernich, C. B., Sultana, R., Mohammad-Abdul, H., Nath, A., and Butterfield, D. A. (2005) HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations, *Brain research. Brain research reviews* 50, 14-26.
261. Sabatier, J. M., Vives, E., Mabrouk, K., Benjouad, A., Rochat, H., Duval, A., Hue, B., and Bahraoui, E. (1991) Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1, *Journal of virology* 65, 961-967.
262. Epie, N., Ammosova, T., Sapir, T., Voloshin, Y., Lane, W. S., Turner, W., Reiner, O., and Nekhai, S. (2005) HIV-1 Tat interacts with LIS1 protein, *Retrovirology* 2, 6.
263. Giacca, M. (2005) HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link?, *Retrovirology* 2, 7.
264. Samikkannu, T., Rao, K. V., Gandhi, N., Saxena, S. K., and Nair, M. P. (2010) Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells: Implications for neuroAIDS, *Journal of neurovirology* 16, 255-263.
265. Samikkannu, T., Saiyed, Z. M., Rao, K. V., Babu, D. K., Rodriguez, J. W., Papuashvili, M. N., and Nair, M. P. (2009) Differential regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) by HIV type 1 clade B and C Tat protein, *AIDS research and human retroviruses* 25, 329-335.
266. Bennasser, Y., Badou, A., Tkaczuk, J., and Bahraoui, E. (2002) Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF-alpha, *Virology* 303, 174-180.
267. Bennasser, Y., Contreras, X., Moreau, M., Le Clerc, C., Badou, A., and Bahraoui, E. (2001) [HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by human monocytes: implications of the PKC and calcium pathway], *Journal de la Societe de biologie* 195, 319-326.
268. Leghmari, K., Bennasser, Y., and Bahraoui, E. (2008) HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways, *European journal of cell biology* 87, 947-962.
269. Leghmari, K., Contreras, X., Moureau, C., and Bahraoui, E. (2008) HIV-1 Tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages: differential implication of PKC-betaII and -delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38, *Cellular immunology* 254, 46-55.
270. Ott, M., Lovett, J. L., Mueller, L., and Verdin, E. (1998) Superinduction of IL-8 in T cells by HIV-1 Tat protein is mediated through NF-kappaB factors, *J Immunol* 160, 2872-2880.
271. Johri, M. K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S. K., and Singh, S. K. (2011) Tits and bits of HIV Tat protein, *Expert opinion on biological therapy* 11, 269-283.
272. Ito, M., Ishida, T., He, L., Tanabe, F., Rongge, Y., Miyakawa, Y., and Terunuma, H. (1998) HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells, *AIDS research and human retroviruses* 14, 845-849.
273. Kaul, M., Zheng, J., Okamoto, S., Gendelman, H. E., and Lipton, S. A. (2005) HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system, *Cell death and differentiation* 12 Suppl 1, 878-892.
274. Contreras, X., Bennasser, Y., and Bahraoui, E. (2004) IL-10 production induced by HIV-1 Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC beta(II) and delta isozymes, *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6, 1182-1190.
275. Contreras, X., Bennasser, Y., Chazal, N., Moreau, M., Leclerc, C., Tkaczuk, J., and Bahraoui, E. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production, *Virology* 332, 316-328.
276. Bennasser, Y., and Bahraoui, E. (2002) HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta, *Faseb J* 16, 546-554.
277. McGettrick, A. F., Brint, E. K., Palsson-McDermott, E. M., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., Gay, N. J., Fitzgerald, K. A., and O'Neill, L. A. (2006) Trif-related adapter molecule is

- phosphorylated by PKC{epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9196-9201.
278. Cuschieri, J., Umanskiy, K., and Solomkin, J. (2004) PKC-zeta is essential for endotoxin-induced macrophage activation, *J Surg Res* 121, 76-83.
 279. Dalot, E., Mehats, C., Oger, S., Leroy, M. J., and Breuiller-Fouche, M. (2005) A role for PKCzeta in the LPS-induced translocation NF-kappaB p65 subunit in cultured myometrial cells, *Biochimie* 87, 513-521.
 280. Kubo-Murai, M., Hazeki, K., Sukenobu, N., Yoshikawa, K., Nigorikawa, K., Inoue, K., Yamamoto, T., Matsumoto, M., Seya, T., Inoue, N., and Hazeki, O. (2007) Protein kinase Cdelta binds TIRAP/Mal to participate in TLR signaling, *Molecular immunology* 44, 2257-2264.
 281. Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudaravalli, R., and Ross, S. R. (2002) Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2281-2286.
 282. Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus, *Nat Immunol* 1, 398-401.
 283. Boehme, K. W., and Compton, T. (2004) Innate sensing of viruses by toll-like receptors, *Journal of virology* 78, 7867-7873.
 284. Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family, *Annual review of immunology* 12, 991-1045.
 285. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults, *Cell* 86, 973-983.
 286. Taguchi, T., Mitcham, J. L., Dower, S. K., Sims, J. E., and Testa, J. R. (1996) Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14, *Genomics* 32, 486-488.
 287. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388, 394-397.
 288. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science* 282, 2085-2088.
 289. Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., and Beutler, B. (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution, *European cytokine network* 11, 362-371.
 290. Ishii, K. J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., and Akira, S. (2008) Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections, *Cell host & microbe* 3, 352-363.
 291. Miller, S. I., Ernst, R. K., and Bader, M. W. (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity, *Nature reviews. Microbiology* 3, 36-46.
 292. Triantafilou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T., and Triantafilou, K. (2006) Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting, *The Journal of biological chemistry* 281, 31002-31011.
 293. Gay, N. J., Gangloff, M., and Weber, A. N. (2006) Toll-like receptors as molecular switches, *Nature reviews. Immunology* 6, 693-698.
 294. Takeuchi, O., and Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell* 140, 805-820.
 295. Blasius, A. L., and Beutler, B. (2010) Intracellular toll-like receptors, *Immunity* 32, 305-315.
 296. Barton, G. M. (2007) Viral recognition by Toll-like receptors, *Semin Immunol* 19, 33-40.
 297. Barton, G. M., Kagan, J. C., and Medzhitov, R. (2006) Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA, *Nature immunology* 7, 49-56.
 298. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature* 413, 732-738.
 299. Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6, *International immunology* 13, 933-940.

300. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, *J Immunol* 169, 10-14.
301. Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., and Gazzinelli, R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite, *J Immunol* 167, 416-423.
302. Wetzler, L. M. (2003) The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity, *Vaccine* 21 Suppl 2, S55-60.
303. Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., and Aderem, A. (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility, *Nature immunology* 4, 1247-1253.
304. Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., and Kosugi, A. (2002) Essential role of MD-2 in B-cell responses to lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 distribution, *Journal of endotoxin research* 8, 449-452.
305. Lee, C. C., Avalos, A. M., and Ploegh, H. L. (2012) Accessory molecules for Toll-like receptors and their function, *Nature reviews. Immunology* 12, 168-179.
306. Juan, T. S., Hailman, E., Kelley, M. J., Wright, S. D., and Lichenstein, H. S. (1995) Identification of a domain in soluble CD14 essential for lipopolysaccharide (LPS) signaling but not LPS binding, *The Journal of biological chemistry* 270, 17237-17242.
307. Muroi, M., Ohnishi, T., and Tanamoto, K. (2002) Regions of the mouse CD14 molecule required for toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF-kappa B, *The Journal of biological chemistry* 277, 42372-42379.
308. Stelter, F., Loppnow, H., Menzel, R., Grunwald, U., Bernheiden, M., Jack, R. S., Ulmer, A. J., and Schutt, C. (1999) Differential impact of substitution of amino acids 9-13 and 91-101 of human CD14 on soluble CD14-dependent activation of cells by lipopolysaccharide, *J Immunol* 163, 6035-6044.
309. Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J., and Lee, J. O. (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran, *Cell* 130, 906-917.
310. Kobayashi, M., Saitoh, S., Tanimura, N., Takahashi, K., Kawasaki, K., Nishijima, M., Fujimoto, Y., Fukase, K., Akashi-Takamura, S., and Miyake, K. (2006) Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering, *J Immunol* 176, 6211-6218.
311. Rietschel, E. T., Brade, H., Brade, L., Brandenburg, K., Schade, U., Seydel, U., Zahringer, U., Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O., and et al. (1987) Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity, *Progress in clinical and biological research* 231, 25-53.
312. Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta, *Nature immunology* 9, 361-368.
313. Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., and Lee, J. O. (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex, *Nature* 458, 1191-1195.
314. Akira, S. (2006) TLR signaling, *Current topics in microbiology and immunology* 311, 1-16.
315. Kagan, J. C., and Medzhitov, R. (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling, *Cell* 125, 943-955.
316. Piao, W., Song, C., Chen, H., Wahl, L. M., Fitzgerald, K. A., O'Neill, L. A., and Medvedev, A. E. (2008) Tyrosine phosphorylation of MyD88 adapter-like (Mal) is critical for signal transduction and blocked in endotoxin tolerance, *The Journal of biological chemistry* 283, 3109-3119.
317. Gray, P., Dunne, A., Brikos, C., Jefferies, C. A., Doyle, S. L., and O'Neill, L. A. (2006) MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction, *The Journal of biological chemistry* 281, 10489-10495.
318. Mansell, A., Brint, E., Gould, J. A., O'Neill, L. A., and Hertzog, P. J. (2004) Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4, *The Journal of biological chemistry* 279, 37227-37230.
319. Rowe, D. C., McGettrick, A. F., Latz, E., Monks, B. G., Gay, N. J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L. A., Fitzgerald, K. A., and Golenbock, D. T. (2006) The myristoylation of TRIF-

- related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6299-6304.
320. Zanon, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F., and Kagan, J. C. (2011) CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4, *Cell* 147, 868-880.
 321. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., and O'Neill, L. A. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses, *Nat Rev Immunol* 5, 446-458.
 322. Iwami, K. I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikachoen, T., and Yoshikai, Y. (2000) Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling, *J Immunol* 165, 6682-6686.
 323. LeBouder, E., Rey-Nores, J. E., Rushmere, N. K., Grigorov, M., Lawn, S. D., Affolter, M., Griffin, G. E., Ferrara, P., Schiffrin, E. J., Morgan, B. P., and Labeta, M. O. (2003) Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk, *J Immunol* 171, 6680-6689.
 324. Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation, *Nature reviews. Immunology* 7, 454-465.
 325. Hu, J., Winqvist, O., Flores-Morales, A., Wikstrom, A. C., and Norstedt, G. (2009) SOCS2 influences LPS induced human monocyte-derived dendritic cell maturation, *PloS one* 4, e7178.
 326. Hamerman, J. A., Tchao, N. K., Lowell, C. A., and Lanier, L. L. (2005) Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12, *Nat Immunol* 6, 579-586.
 327. Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L., and Bowie, A. G. (2005) Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence, *J Exp Med* 201, 1007-1018.
 328. Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., Hayashi, N., Akira, S., and Matsuura, Y. (2007) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines, *Journal of virology* 81, 8953-8966.
 329. Carrington, M., Nelson, G., and O'Brien, S. J. (2001) Considering genetic profiles in functional studies of immune responsiveness to HIV-1, *Immunology letters* 79, 131-140.
 330. Bochud, P. Y., Hersberger, M., Taffe, P., Bochud, M., Stein, C. M., Rodrigues, S. D., Calandra, T., Francioli, P., Telenti, A., Speck, R. F., and Aderem, A. (2007) Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection, *AIDS* 21, 441-446.
 331. Biasin, M., Piacentini, L., Lo Caputo, S., Naddeo, V., Pierotti, P., Borelli, M., Trabattini, D., Mazzotta, F., Shearer, G. M., and Clerici, M. (2010) TLR activation pathways in HIV-1-exposed seronegative individuals, *J Immunol* 184, 2710-2717.
 332. Meier, A., Bagchi, A., Sidhu, H. K., Alter, G., Suscovich, T. J., Kavanagh, D. G., Streeck, H., Brockman, M. A., LeGall, S., Hellman, J., and Altfeld, M. (2008) Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands, *AIDS* 22, 655-658.
 333. Schlaepfer, E., Audige, A., Joller, H., and Speck, R. F. (2006) TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection, *J Immunol* 176, 2888-2895.
 334. Vaknin, I., Blinder, L., Wang, L., Gazit, R., Shapira, E., Genina, O., Pines, M., Pikarsky, E., and Baniyash, M. (2008) A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression, *Blood* 111, 1437-1447.
 335. O'Garra, A., and Vieira, P. (2007) T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10, *Nature reviews. Immunology* 7, 425-428.
 336. Clerici, M., and Shearer, G. M. (1994) The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights, *Immunology today* 15, 575-581.
 337. Clerici, M., and Shearer, G. M. (1994) Cellular immunity and a type 1 cytokine profile in protection against HIV infection and progression to AIDS, *Research in immunology* 145, 635-641; discussion 641-633.
 338. Diaz-Mitoma, F., Kumar, A., Karimi, S., Kryworuchko, M., Daftarian, M. P., Creery, W. D., Filion, L. G., and Cameron, W. (1995) Expression of IL-10, IL-4 and interferon-gamma in unstimulated and mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from HIV-seropositive patients, *Clinical and experimental immunology* 102, 31-39.
 339. Dyer, J. R., Hoffman, I. F., Eron, J. J., Jr., Fiscus, S. A., and Cohen, M. S. (1999) Immune activation and plasma viral load in HIV-infected African individuals, *AIDS* 13, 1283-1285.
 340. Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., and Dandekar, S. (2003) Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human

- immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy, *Journal of virology* 77, 11708-11717.
341. Morini, M., Benelli, R., Giunciuglio, D., Carlone, S., Arena, G., Noonan, D. M., and Albin, A. (2000) Kaposi's sarcoma cells of different etiologic origins respond to HIV-Tat through the Flk-1/KDR (VEGFR-2): relevance in AIDS-KS pathology, *Biochemical and biophysical research communications* 273, 267-271.
 342. Pantaleo, G., Graziosi, C., and Fauci, A. S. (1993) The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection, *Seminars in immunology* 5, 157-163.
 343. Clerici, M., Hakim, F. T., Venzon, D. J., Blatt, S., Hendrix, C. W., Wynn, T. A., and Shearer, G. M. (1993) Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals, *The Journal of clinical investigation* 91, 759-765.
 344. Boehme, K. W., Singh, J., Perry, S. T., and Compton, T. (2004) Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B, *Journal of virology* 78, 1202-1211.
 345. Zhou, S., Halle, A., Kurt-Jones, E. A., Cerny, A. M., Porpiglia, E., Rogers, M., Golenbock, D. T., and Finberg, R. W. (2008) Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection of CNS glial cells results in TLR2-MyD88/Mal-dependent inflammatory responses, *Journal of neuroimmunology* 194, 70-82.
 346. Kim, D. C., Kim, S. H., Jeong, M. W., Baek, N. I., and Kim, K. T. (2005) Effect of rottlerin, a PKC-delta inhibitor, on TLR-4-dependent activation of murine microglia, *Biochem Biophys Res Commun* 337, 110-115.
 347. Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Yeol Kim, J., and Abraham, E. (2005) Involvement of PKCalpha/beta in TLR4 and TLR2 dependent activation of NF-kappaB, *Cell Signal* 17, 385-394.
 348. Shinohara, H., Yasuda, T., Aiba, Y., Sanjo, H., Hamadate, M., Watarai, H., Sakurai, H., and Kurosaki, T. (2005) PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1, *J Exp Med* 202, 1423-1431.
 349. Cohen, P. S., Schmidtmayerova, H., Dennis, J., Dubrovsky, L., Sherry, B., Wang, H., Bukrinsky, M., and Tracey, K. J. (1997) The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication, *Mol Med* 3, 339-346.
 350. Asin, S., Bren, G. D., Carmona, E. M., Solan, N. J., and Paya, C. V. (2001) NF-kappaB cis-acting motifs of the human immunodeficiency virus (HIV) long terminal repeat regulate HIV transcription in human macrophages, *Journal of virology* 75, 11408-11416.
 351. Gutierrez-Sanmartin, D., Varela-Ledo, E., Aguilera, A., Romero-Yuste, S., Romero-Jung, P., Gomez-Tato, A., and Regueiro, B. J. (2008) Implication of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms (alpha, beta, gamma and delta) in CD4+ T-cell infection with human immunodeficiency virus type I, *The Journal of general virology* 89, 1661-1671.
 352. Muthumani, K., Choo, A. Y., Hwang, D. S., Premkumar, A., Dayes, N. S., Harris, C., Green, D. R., Wadsworth, S. A., Siekierka, J. J., and Weiner, D. B. (2005) HIV-1 Nef-induced FasL induction and bystander killing requires p38 MAPK activation, *Blood* 106, 2059-2068.
 353. Paruch, S., Heinis, M., Lemay, J., Hoeffel, G., Maranon, C., Hosmalin, A., and Perianin, A. (2007) CCR5 signaling through phospholipase D involves p44/42 MAP-kinases and promotes HIV-1 LTR-directed gene expression, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 4038-4046.
 354. Salaria, S., Badkoobehi, H., Rockenstein, E., Crews, L., Chana, G., Masliah, E., and Everall, I. P. (2007) Toll-like receptor pathway gene expression is associated with human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration, *J Neurovirol* 13, 496-503.
 355. Mege, J. L., Meghari, S., Honstetter, A., Capo, C., and Raoult, D. (2006) The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases, *Lancet Infect Dis* 6, 557-569.
 356. Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B. J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S. G., Van Grevenynghe, J., Boulassel, M. R., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Routy, J. P., Douek, D. C., Haddad, E. K., and Sekaly, R. P. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection, *Nat Med* 16, 452-459.
 357. Hoshi, M., Saito, K., Hara, A., Taguchi, A., Ohtaki, H., Tanaka, R., Fujigaki, H., Osawa, Y., Takemura, M., Matsunami, H., Ito, H., and Seishima, M. (2010) The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse, *J Immunol* 185, 3305-3312.

358. Favre, D., Mold, J., Hunt, P. W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J. D., Lowe, M. M., Jayawardene, A., Aweeka, F., Huang, Y., Douek, D. C., Brenchley, J. M., Martin, J. N., Hecht, F. M., Deeks, S. G., and McCune, J. M. (2010) Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease, *Science translational medicine* 2, 32ra36.
359. Boasso, A., Hardy, A. W., Landay, A. L., Martinson, J. L., Anderson, S. A., Dolan, M. J., Clerici, M., and Shearer, G. M. (2008) PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by HIV via type I interferon: restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes, *Clin Immunol* 129, 132-144.
360. Akhtar, L. N., and Benveniste, E. N. (2011) Viral exploitation of host SOCS protein functions, *Journal of virology* 85, 1912-1921.
361. Akhtar, L. N., Qin, H., Muldowney, M. T., Yanagisawa, L. L., Kutsch, O., Clements, J. E., and Benveniste, E. N. (2010) Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits antiviral IFN-beta signaling to enhance HIV-1 replication in macrophages, *J Immunol* 185, 2393-2404.
362. Ogata, H., Kobayashi, T., Chinen, T., Takaki, H., Sanada, T., Minoda, Y., Koga, K., Takaesu, G., Maehara, Y., Iida, M., and Yoshimura, A. (2006) Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis, *Gastroenterology* 131, 179-193.
363. Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Soeda, H., Hattori, S., Perrem, K., Yamamoto, M., Chiba, J., Mimaya, J., Yoshimura, K., Matsushita, S., Honda, M., Yoshimura, A., Sawasaki, T., Aoki, I., Morikawa, Y., and Yamamoto, N. (2008) SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 294-299.
364. Vazquez, N., Greenwell-Wild, T., Rekka, S., Orenstein, J. M., and Wahl, S. M. (2006) Mycobacterium avium-induced SOCS contributes to resistance to IFN-gamma-mediated mycobactericidal activity in human macrophages, *Journal of leukocyte biology* 80, 1136-1144.
365. Zimmermann, S., Murray, P. J., Heeg, K., and Dalpke, A. H. (2006) Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by Toxoplasma gondii contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling, *J Immunol* 176, 1840-1847.
366. Frey, K. G., Ahmed, C. M., Dabelic, R., Jager, L. D., Noon-Song, E. N., Haider, S. M., Johnson, H. M., and Bigley, N. J. (2009) HSV-1-induced SOCS-1 expression in keratinocytes: use of a SOCS-1 antagonist to block a novel mechanism of viral immune evasion, *J Immunol* 183, 1253-1262.
367. Pauli, E. K., Schmolke, M., Wolff, T., Viemann, D., Roth, J., Bode, J. G., and Ludwig, S. (2008) Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression, *PLoS pathogens* 4, e1000196.